



Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Mestrado Integrado em Medicina

Trabalho Final de Mestrado

6º ano

Ano letivo 2015-2016

**A Fronteira Nebulosa entre Terapêutica e *Doping*:
Os Agonistas β 2-Adrenérgicos no Desporto
(Revisão da Literatura)**

Aluno: André Matos Delgado, nº: 12703

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Dr.^a Mónica Mendes Pedro.

Clínica Universitária de Cardiologia.

Diretor: Professor Doutor Fausto Pinto.

Índice

1. Resumo	2
2. Introdução.....	3
3. A utilização de estimulantes β -adrenérgicos	5
4. Acção fisiológica do Sistema Adrenérgico.....	6
5. Receptores adrenérgicos: porquê os receptores β 2?	7
5.1. Receptores β	10
5.1.1. Receptores β 1	10
5.1.2. Receptores β 2.....	11
5.1.3. Receptores β 3.....	12
6. Evidência <i>in vitro</i> e em animais dos efeitos hipertróficos dos agonistas β	13
6.1. Efeitos hipertróficos	14
6.2. Efeitos Celulares.....	16
6.3. Efeito sob exercício físico.....	17
6.4. Efeito específico sobre os diferentes tipos de fibras musculares	18
6.5. Alterações nas propriedades contrácteis.....	22
6.6. Efeito farmacológico a longo prazo	23
7. Por que mecanismo actuam os agonistas β 2?	24
7.1. Hipertrofia ou inibição de atrofia	24
7.2. Mecanismos directos ou indirectos?	24
7.3. Mecanismo de acção molecular e transducção de sinal	25
7.3.1. Via da Gas-AC-cAMP	26
7.3.2. Efeitos da activação da PCA no músculo esquelético.....	28
7.3.3. Vias de sinalização independentes da PCA	30
7.3.4. Regulação dos receptores.....	31
8. A atracção dos agonistas β 2.....	33
9. Efeitos ergogénicos em humanos: o que sabemos?.....	34
9.1. Fármacos inalados.....	34
9.2. Fármacos Oraís	36
10. Conclusão	38
11. Agradecimentos	39
12. Bibliografia	40

1. Resumo

Resumo

O *doping*, isto é, a utilização de substâncias químicas com o intuito de aumentar o desempenho desportivo, é uma prática que remonta aos primórdios da competição desportiva organizada. Entre as diversas substâncias implicadas encontram-se fármacos de prescrição médica cuja utilização é muito tentadora, tais como os **agonistas β 2-adrenérgicos**. Estes têm gerado muito interesse embora a evidência existente na literatura acerca do seu potencial ergogénico seja controversa e a sua utilização se encontre interdita pela *WADA* a desportistas de alta competição.

Neste trabalho é realizada uma revisão da evidência científica existente acerca dos agonistas β -adrenérgicos, do seu mecanismo de acção no organismo humano, dos efeitos demonstrados *in vitro* e em animais e nos estudos realizados em seres humanos, procurando clarificar se estes fármacos conferem uma vantagem a quem os utiliza e se este efeito está dependente do tempo e via de administração ou substância utilizada.

Abstract

Doping refers to the use of chemical substances with the intent of improving physical performance in sports and it dates back to the beginning of organized sports practice. Among the numerous substances which may be used, medically prescribed drugs are some of the most appealing ones. **β 2-adrenergic agonists** in particular have been getting much attention lately although the evidence in literature regarding their ergogenic potential is controversial. Nevertheless, their use at competition level is banned by *WADA*.

In this work, the scientific evidence available to date about β 2-adrenergic agonists is reviewed, with emphasis on their mechanism of action in the human body, on the effects demonstrated *in vitro* and in animal studies and on trials conducted in humans. An attempt is made to clarify if these drugs do indeed give an advantage to those who use them and if that is related to the timing, the duration and the route of administration or the substance used.

2. Introdução

O *doping*, nome atribuído à tentativa de melhorar a performance desportiva mediante a utilização de substâncias químicas, é uma prática difundida pela comunidade desportiva, amadora e profissional, cuja origem remonta ao início da competição desportiva organizada. De facto, é na Antiga Grécia que surgem os primeiros relatos da administração de substâncias exógenas com o intuito de melhorar o rendimento desportivo, sob a forma de fungos com propriedades alucinogéneas (Fig.1) e possivelmente estricnina (Fig.2), um neuroestimulante antagonista dos receptores de glicina. Esta última substância foi utilizada pelo maratonista Thomas Hicks em 1904 que, ao adicioná-la a *brandy*, conseguiu vencer a maratona (e quase morrer por intoxicação).^{1,2}



Figura 1: Cravagem do fungo alucinogénico *Claviceps purpureae* numa espiga de trigo³



Figura 2: *Strychnos nux-vomica*, principal fonte de estricnina (concentrada na semente)⁴

Embora os relatos de abuso de substâncias no desporto se tenham sucedido ao longo do tempo, foi apenas nos Jogos Olímpicos de 1960 que o trágico falecimento de um ciclista dinamarquês levou à criação da *Comissão Médica* pelo Comité Olímpico Internacional. Assim, em 1967, foi publicada “A Lista”, contendo um conjunto de substâncias e de métodos proibidos na prática desportiva de competição e que inicialmente era apenas constituída por estimulantes e narcóticos. À medida que os avanços tecnológicos e

científicos permitiam identificar novas substâncias e métodos de detecção, “A Lista” foi sofrendo modificações progressivas.^{1,2}

Em 2004, a *World Anti-Doping Agency* (WADA) assumiu a responsabilidade pela actualização daquele documento. Os critérios por ela utilizados para a inclusão de substâncias nesta lista são: aumentarem o rendimento desportivo, serem prejudiciais à saúde ou estarem contra o espírito do desporto.^{1,2}

De entre as múltiplas substâncias interditas durante a prática desportiva, sem dúvida que os esteróides anabolizantes são os mais divulgados na comunidade médica e desportiva. Contudo, os próprios fármacos legitimamente prescritos pelos médicos para tratar inúmeras patologias podem ser usados de forma abusiva e perniciosa com o intuito de aumentar a performance desportiva. Estes fármacos podem ser tão ou mais eficazes, bem como perigosos, que os esteróides anabolizantes.

Considerando os vários medicamentos nestas circunstâncias, alguns apresentam mecanismos de acção que em si mesmos justificam o seu potencial para aumentar o rendimento desportivo, dos quais é exemplo a acção anabólica da insulina. Outros podem ser utilizados quer como agentes “mascarantes”, diminuindo a probabilidade de detecção de outras substâncias na urina, quer para obter perdas agressivas de peso e alcançar classes de peso, de que são típicos os diuréticos.

Os agonistas β -adrenérgicos (em especial, os β_2 -adrenérgicos) são fármacos com acção inotrópica e cronotrópica positivas e broncodilatadora. São comumente utilizados na terapêutica dos síndromes asmáticas, constituindo até um dos pilares do tratamento destas situações, muitas vezes com necessidade de administração crónica. O seu uso encontra-se interdito a atletas profissionais, à excepção de alguns fármacos administrados sob a forma inalada e apenas mediante a atribuição de uma Dispensa de Uso Terapêutico (DUT). No entanto, existe informação divergente na literatura acerca do potencial ergogénico destes fármacos e do seu possível modo de actuação.

O objectivo do presente estudo de revisão é explicar como os agonistas β_2 -adrenérgicos actuam a nível celular, rever os seus efeitos sobre o organismo do atleta e clarificar o seu papel na modulação da performance desportiva.

3. A utilização de estimulantes β -adrenérgicos

Um estimulante pode ser visto como qualquer agente que aumenta uma função endógena, muitas vezes mimetizando a acção de um neurotransmissor excitatório ou antagonizando a acção de um neurotransmissor inibitório.⁵ Contudo, no âmbito desportivo, este termo aplica-se sobretudo a agentes que afectem o funcionamento do Sistema Nervoso Central (SNC) ou do Sistema Nervoso Periférico (SNP) simpático⁵, sendo que muitos dos efeitos desejados destas substâncias ocorrem por actuação directa e indirecta sobre os receptores β -adrenérgicos nestas localizações.⁶

A maioria dos estimulantes actuam sobre sistemas monoaminérgicos (adrenérgico, dopaminérgico e serotoninérgico) e podem ser utilizados por uma de três grandes razões:⁵

- Inadvertidamente (ou alegadamente) como fármaco prescrito pelo médico assistente com uma indicação clínica concreta e adequada.
- Consumo deliberado como droga recreacional.
- Consumo deliberado para aumentar a performance desportiva.

Os fármacos com acção estimulante sobre o sistema nervoso adrenérgico têm sido alvo de um interesse elevado por parte de diversos elementos da comunidade desportiva com o intuito de aumentar a performance desportiva. De facto, muitas das substâncias usadas de modo ilícito, recreativa e profissionalmente, têm um efeito directo ou indirecto sobre este sistema e tal não é surpreendente dada a acção bem conhecida dos ligandos endógenos dos receptores adrenérgicos no ser humano (em particular a adrenalina e a noradrenalina).

À medida que a secreção fisiológica de adrenalina e de noradrenalina para a corrente sanguínea sofre um aumento exponencial em resposta a situações de *stress*, de medo ou de exercício físico, a sua acção sobre o desempenho físico torna-se evidente, o que a torna um alvo atraente para desportistas em busca de uma vantagem desleal.⁶

4. Acção fisiológica do Sistema Adrenérgico

O Sistema Nervoso Autónomo regula as actividades de estruturas sem controlo voluntário e de funcionamento “subconsciente”, como a ventilação, a circulação, a digestão, a temperatura corporal e o metabolismo, a sudção e as secreções endócrinas.⁷

Enquanto que o Sistema Nervoso Parassimpático está organizado para efectuar “descargas” discretas e localizadas relacionadas com a conservação de energia e a manutenção das funções orgânicas, o Sistema Nervoso Simpático está continuamente activo, podendo também sofrer aumentos de actividade “em pico” em resposta a situações de *stress* fisiológico, tal como o exercício físico.

As células que dão origem às fibras nervosas pré-ganglionares localizam-se entre as colunas médias e laterais da medula espinhal, estendendo-se de T1 a L2/L3. Os seus axónios caminham nas raízes anteriores ou ventrais e sinapsam com neurónios pós-sinápticos em gânglios simpáticos exteriores ao neuroeixo (paravertebrais, pré-vertebrais e terminais). As fibras pós-ganglionares, por sua vez, inervam as estruturas viscerais da cabeça, do pescoço, do tórax e do abdómen.

Os ligandos endógenos que actuam no sistema adrenérgico são:^{6,7}

- **Noradrenalina:** libertada como neurotransmissor pela maioria das fibras nervosas simpáticas pós-ganglionares, é um agonista α e β (com maior selectividade para o receptor $\beta 1$ e com menor efeito sobre o receptor $\beta 2$). Provoca uma elevação da Resistência Vascular Periférica (RVP) e da Pressão Arterial (PA) e apresenta um efeito inotrópico positivo.
- **Adrenalina:** libertada pela medula supra-renal mediante estímulo colinérgico e actuando como neurotransmissor em alguns neurónios no SNC. É um agonista α e β e provoca uma elevação da PA por vasoconstrição de vários territórios vasculares (α) e por inotropismo e cronotropismo positivos ($\beta 1$), causando também vasodilatação do território vascular dos músculos esqueléticos ($\beta 2$). Foi exactamente esta acção menos selectiva sobre os receptores $\beta 1$ e com maior efeito sobre os receptores $\beta 2$ (no território muscular) que despertou grande interesse sobre as capacidades desta substância e dos seus análogos em aumentar a performance desportiva.

5. Receptores adrenérgicos: porquê os receptores β_2 ?

A adrenalina e a noradrenalina produzem os seus efeitos no organismo humano através da sua ligação aos receptores adrenérgicos. Todos estes receptores pertencem à família dos Receptores Ligados a Proteínas G (RLPG), isto é, o receptor, quando estimulado, activa uma proteína G que se lhe encontra acoplada, a qual exerce função de 2º mensageiro intracelular. Os RLPG são o maior grupo de receptores de membrana celular em mamíferos e constituem mais de 1% do genoma humano.⁸

Todos os RLPG apresentam uma estrutura base idêntica. São formados por uma proteína transmembranar com sete hélices- α , as quais determinam três *loops* extracelulares (com o terminal amina-NH₂) e três intracelulares (com o terminal carboxilo-COOH). São sobretudo as regiões intramembranares que têm sequências de aminoácidos diferentes consoante os vários tipos de RLPG, tornando-os diferentes entre si. As regiões intramembranares 3 e 5 têm importância na ligação de agonistas, enquanto que o terceiro *loop* intracelular tem um papel essencial na ligação à proteína G.^{6,8} Finalmente, o mesmo terceiro *loop* intracelular e a região terminal carboxilo têm zonas susceptíveis de sofrer fosforilação, a qual modifica a acção do receptor, podendo, por exemplo, inactivá-lo. (Fig.3)

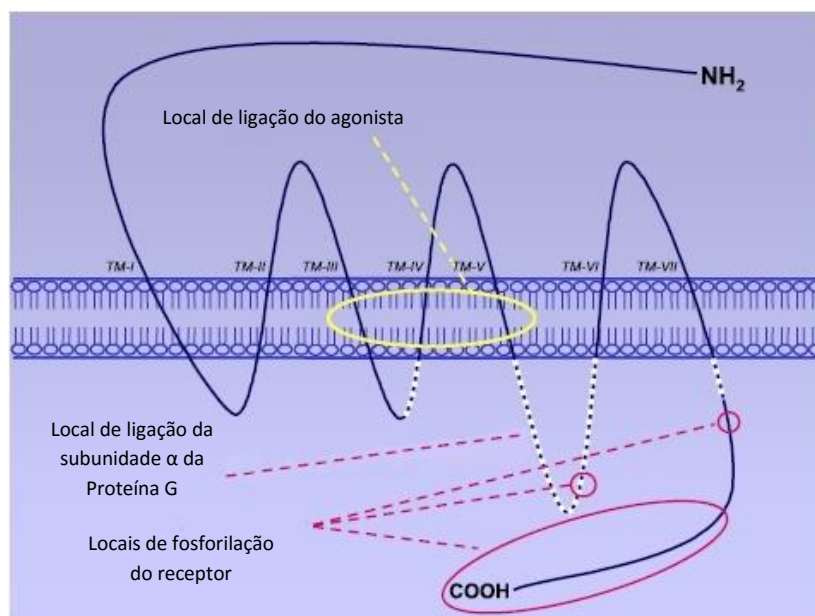


Figura 3: Estrutura básica do RLPG com indicação dos locais de ligação do agonista e da Proteína G e dos locais de fosforilação do receptor (onde se encontram grupos hidroxilo).⁸

A Proteína G é constituída por 3 subunidades: α , β e γ . No seu estado inactivo, a subunidade α liga-se ao terceiro *loop* intracelular do RLPG e também ao dímero formado pelas subunidades β e γ , encontrando-se este, do mesmo modo, intimamente ligado à membrana plasmática intercelular. A subunidade α encontra-se igualmente conectada a uma molécula de guanosina difosfato (GDP). Quando o receptor é activado, ocorre uma alteração conformacional no receptor e na subunidade α , levando à libertação de GDP da subunidade α e à ligação subsequente de guanosina trifosfato (GTP) citoplasmática no lugar daquele. Seguidamente, dá-se a dissociação da Proteína G do receptor e, na Proteína G, a separação da subunidade α do dímero $\beta\gamma$. Este fenómeno provoca a activação da subunidade α -GTP e das subunidades β e γ , possibilitando a iniciação de diferentes vias efectoras de sinalização intracelular.⁸ Mais tarde, o GTP ligado à subunidade α activa da proteína G é hidrolizado em GDP, o que provoca a reassociação das diferentes subunidades e a formação da proteína G inactiva ligada ao RLPG, encerrando o ciclo. (Fig.4)

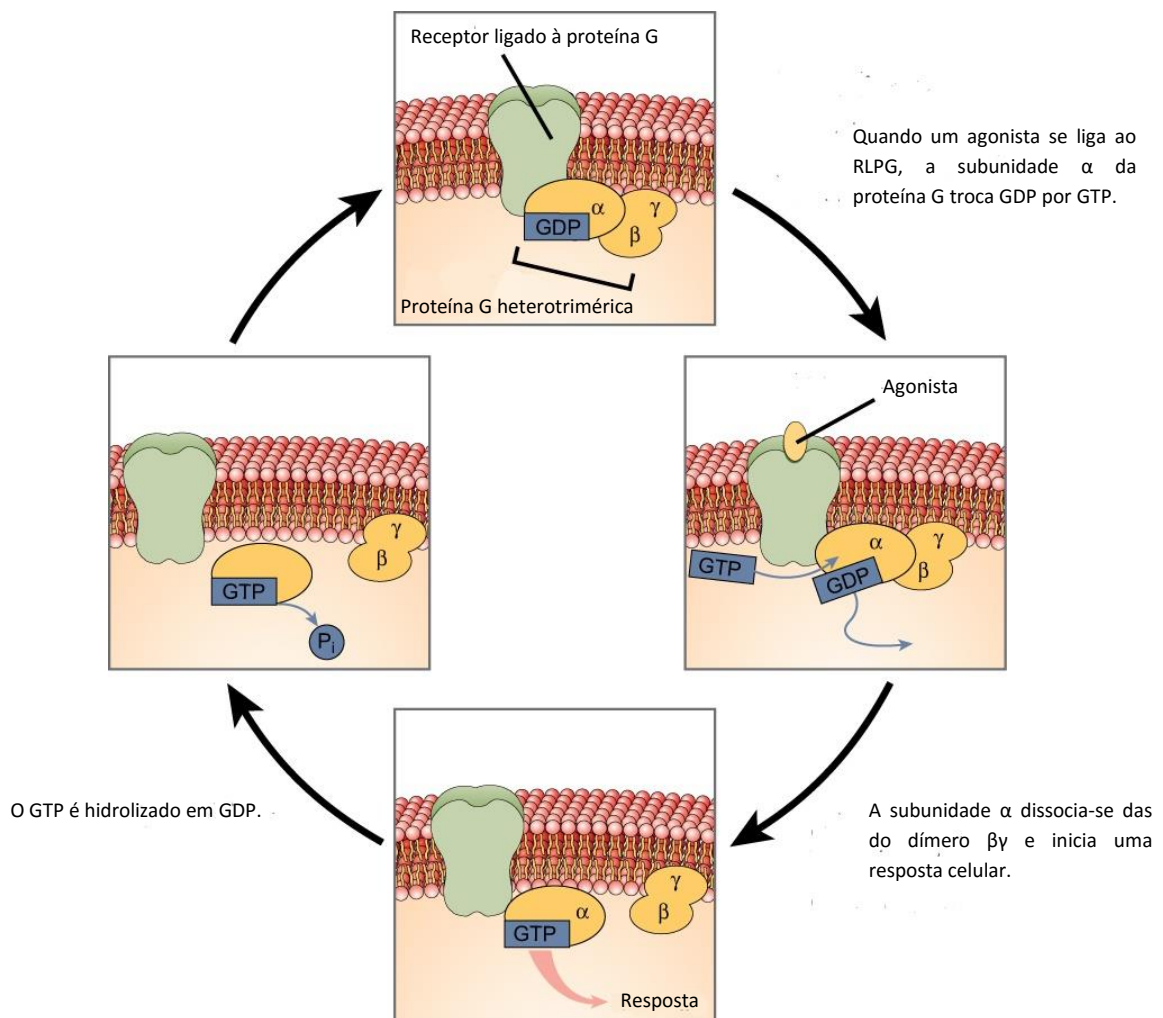


Figura 4: Ciclo de activação do receptor ligado à proteína G⁹
(GTP, guanina trifosfato; GDP, guanina difosfato).

Existem diversas famílias de subunidades α (α_s , α_i e α_q) que vão permitir classificar as proteínas G em grupos distintos (Gs, Gi e Gq), com efeitos particulares sobre as vias intracelulares.

Assim, a proteína Gs provoca um aumento da concentração intracelular de cAMP. Pelo contrário, a proteína Gi provoca uma diminuição da concentração intracelular da mesma molécula. A proteína Gq é responsável pela estimulação da fosfolipase C que leva à formação de diacilglicerol (DAG) e de inositol trifosfato (IP_3) e ao aumento da concentração intracelular de cálcio (Ca^{2+}). (Fig.5)

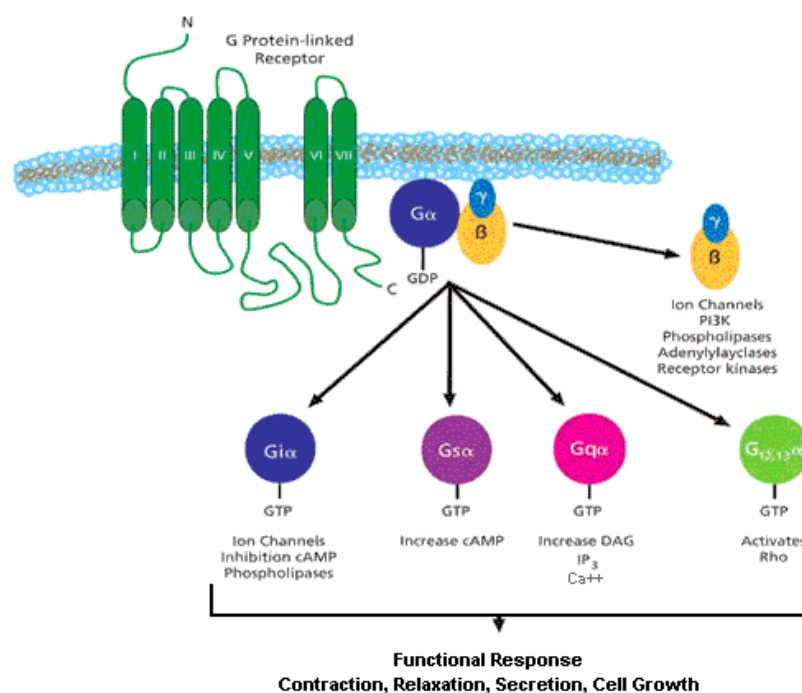


Figura 5: Conjunto receptor-Proteína G e suas acções intracelulares mais importantes, dependentes do subtipo de subunidade α da Proteína G e do dímero $\beta\gamma$ ¹⁰

(PI3K, fosfoinositol 3-cinase; DAG, diacilglicerol; cAMP, adenosina monofosfato cíclica; GTP, guanina trifosfato; GDP, guanina difosfato)

Os receptores adrenérgicos dividem-se em dois tipos, α e β . Duas famílias principais de receptores α foram identificadas, α_1 e α_2 , que são subdivididas em seis subtipos: α_1A , α_1B , α_1D , α_2A , α_2B e α_2C . Por sua vez, os receptores β dividem-se em três subtipos (β_1 , β_2 e β_3).⁸

Os receptores $\alpha 1$ e $\alpha 2$ estão acoplados a proteínas Gq e Gi, respectivamente. Por outro lado, todos os subtipos de receptor β estão ligados a proteínas Gs. Contudo, o receptor $\beta 2$ também pode estar ligado a proteínas Gi.

5.1. Receptores β

Os receptores β apresentam um papel regulador nas funções cardiovascular, respiratória, metabólica e reprodutora.

Como referido acima, existem 3 subtipos destes receptores: $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$. São sintetizados a partir de genes distintos e têm uma homologia de 40-50%⁶ a 65-70%⁸. Todos estes receptores, quando activados, podem sinalizar diferentes vias efectoras e levar a um aumento dos níveis intracelulares de cAMP.⁶

5.1.1. Receptores $\beta 1$

Os receptores $\beta 1$ são encontrados em diversas áreas do corpo humano, incluindo o coração, o rim, o tecido adiposo branco e o SNC (em particular na hipófise).^{6,7} Encontram-se também em pequena quantidade no músculo esquelético (7-10%).⁸

A sua activação provoca efeitos cardíacos cronotrópicos e inotrópicos positivos, libertação de renina do aparelho juxtaglomerular renal e aumento da lipólise. Além disso, é ainda responsável pela secreção de melatonina pela glândula pineal, podendo ter um papel relevante na modulação do humor.⁶ Embora os receptores $\beta 2$ sejam classicamente vistos como predominantes na árvore vascular, existe evidência de que os receptores $\beta 1$ provocam vasodilatação em certos territórios, como as artérias mesentérica superior, pulmonar e femoral em modelos animais.⁶

Os efeitos deletérios da activação crónica destes receptores no tecido cardíaco encontram-se bastante estudados, estando associados à apoptose dos cardiomiócitos e a um aumento da mortalidade. Esta pode ser uma das razões que explica o aumento considerável de risco de eventos cardíacos em consumidores de cocaína e de anfetaminas para fins desportivos e no grande sucesso da terapêutica β -bloqueante no tratamento da Insuficiência Cardíaca (IC).⁶

5.1.2. Receptores $\beta 2$

Os receptores $\beta 2$ têm uma distribuição ainda mais ampla do que os receptores $\beta 1$ no corpo humano.⁶ Estão presentes no coração (até 40%), no pulmão, nos músculos lisos brônquico e gastrointestinal, nos vasos sanguíneos, no rim, no SNC e no músculo esquelético (mais de 90% dos receptores adrenérgicos existentes neste tecido).^{7,8}

A sua activação provoca efeitos cardíacos cronotrópicos e inotrópicos positivos, broncodilatação, redução da libertação de mediadores broncoconstritores e aumento da libertação de surfactante e de muco no pulmão. Além disso, leva a vasodilatação dos pequenos vasos coronários e dos vasos sanguíneos do músculo esquelético, existindo evidência de que causa um aumento do crescimento muscular e da velocidade de contracção, da glicogenólise muscular e tremor. No pâncreas, é responsável por um aumento da secreção de insulina e de glicagina e, no fígado, por um aumento da glicogenólise.⁶

Embora o papel da sua expressão durante a diferenciação muscular e os mecanismos através dos quais exerce a sua acção não estejam completamente elucidados¹¹, a sua elevada concentração no músculo esquelético e os seus aparentes efeitos ergogénicos, anabólicos, broncodilatadores e anti-inflamatórios (associados à aparente ausência de efeitos deletérios cardíacos decorrentes da sua activação crónica) tornaram este subtipo de receptor um alvo particularmente atraente para o desenvolvimento de terapêutica dirigida contra a caquexia e a fraqueza muscular presente em diversos estados de doença, como o cancro, a sépsis e outras formas de *stress* catabólico, a deservação, as queimaduras, a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA), a Doença Renal Crónica (DRC) e a Insuficiência Cardíaca, a Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (DPOC) e as distrofias musculares.⁸ Além disso, tem também sido avaliada a sua eficácia enquanto terapêutica dirigida à sarcopenia e à atrofia muscular em condições de microgravidade ou de gravidade zero.

Estes efeitos decorrentes da activação do receptor tornam-no um alvo extremamente tentador para aqueles que procuram aumentar o seu desempenho desportivo, tendo sido interdita a utilização de substâncias com acção sobre este receptor pela WADA (Agência Mundial Anti-Doping) durante competições e fora delas, à excepção dos atletas com uma DUT.

5.1.3. Receptores $\beta 3$

O terceiro subtipo de receptor beta tem sido menos estudado e explorado terapeuticamente do que os receptores $\beta 1$ e $\beta 2$.⁶ Está amplamente distribuído pelos tractos gastrointestinal e genitourinário, pelo útero, pelos tecidos adiposos branco e castanho, pelo SNC e pelo coração.^{6,7} Existe evidência que a sua activação estimula a lipólise e a termogénese.

Tem sido investigada a sua eficácia no tratamento da obesidade, sendo que alguns agonistas selectivos podem apresentar utilidade no tratamento do Síndrome do Cólon Irritável e como agente tocolítico. (Tabela 1)

Receptor	Mecanismo	Localização	Efeito
$\beta 1$	Gs (activação da AC e \uparrow cAMP)	Coração, rim, tecido adiposo branco e SNC	Cronotropismo e inotropismo positivos, libertação de renina pelo AJG, estimulação da lipólise, secreção de melatonina
$\beta 2$	Gs (activação da AC e \uparrow cAMP); Gi (inibição da AC e \downarrow cAMP)	Coração, pulmão, músculo liso brônquico e GI, vasos sanguíneos, rim, SNC e músculo esquelético	Cronotropismo e inotropismo positivos; broncodilatação; vasodilatação de pequenos vasos coronários e vasos do músculo esquelético; \uparrow secreção pancreática de insulina e glicagina; \uparrow glicogenólise hepática
$\beta 3$	Gs (activação da AC e \uparrow cAMP)	Tractos GI e GU, útero, tecidos adiposos branco e castanho, SNC e coração	\uparrow lipólise e termogénese

Tabela 1: Subtipos do receptor β : mecanismo de acção, localização e efeito

(AC: adenilato ciclase; cAMP: adenosina monofosfato cíclica; SNC: sistema nervoso central;
GI: gastrointestinal; GU, genitourinário; AJG: aparelho juxtaglomerular)

6. Evidência *in vitro* e em animais dos efeitos hipertróficos dos agonistas β

Embora seja difícil precisar quando surgiu a evidência inicial de que os agonistas β_2 exerciam um efeito anabólico e hipertrofiante, os primeiros relatos parecem ter surgido no universo veterinário associados a uma substância designada por clenbuterol.

O clenbuterol é um agonista β -adrenérgico com selectividade β_2 , de longa duração de acção e muito potente. Tem acção broncodilatadora e está disponível sob formulação líquida para o tratamento de episódios de broncoespasmo em cavalos. Embora esteja licenciado para o tratamento da asma em humanos nalguns países (Bulgária, Rússia e China), a sua utilização em seres humanos não se encontra aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos da América e foi descontinuada em Portugal.

Foi descoberto que esta substância apresentava um efeito distributivo em animais, sendo capaz de aumentar a massa muscular e de diminuir a massa gorda. Este efeito foi rapidamente aproveitado pela indústria pecuária com o intuito de otimizar a produção de carne para a alimentação, ao aumentar a taxa de transformação de ração animal em massa corporal em diversas espécies animais, tentando aumentar a quantidade e a qualidade da carne e rentabilizar ao máximo cada animal.⁶ Também em concursos de animais este fármaco foi utilizado com o objectivo de desenvolver um porte mais magro e musculado.

Ao longo dos anos, têm ocorrido múltiplos episódios de intoxicação humana aguda a clenbuterol em vários países pelo consumo de produtos alimentares (como carne de vaca e de porco) derivados de animais aos quais tinha sido administrado este fármaco. Tal levou à proibição da sua administração em todos os animais que possam vir a ser utilizados para consumo humano (quer sejam criados com esse intuito ou não), desde 1991 nos EUA e desde 1996 na Europa. De facto, o fármaco é acumulado no fígado e no músculo dos animais aos quais é administrado¹² e, nas concentrações medidas em amostras contaminadas, os efeitos farmacológicos em humanos são expectáveis após a ingestão de 100 a 200 gramas do produto em questão.¹³

Salleras investigou 113 casos reportados de intoxicação por esta substância na Catalunha em 1992, tendo verificado que os doentes afectados apresentavam

frequentemente um quadro de taquicardia (93,8%), tremor muscular (93,8%), nervosismo (91,2%), cefaleias (69%) e mialgias (64,6%), sendo menos comum a presença de dor retro-ocular (31,8%), de vômitos (23%), de astenia (20,4%) e de náusea (12,4%). O período de incubação estendia-se de 15 minutos a 6 horas e a duração dos sintomas de 90 minutos a 6 dias. Foi ainda possível detectar a presença do agonista β em amostras de urina de 47 indivíduos, mas não em amostras sanguíneas.¹²

Também no nosso país se encontram relatados casos de intoxicação⁸ que motivaram Ramos, em 2009, a recolher centenas de amostras de água e ração usadas em 16 quintas de pecuária portuguesas, além de urina e pêlo dos animais lá criados. Embora não tenha sido isolado nenhum agonista β nas amostras de ração, de urina e de pêlo, aproximadamente 14% das amostras de água estavam contaminadas com clenbuterol (no intervalo de 0,03 a 3,80 mg/L), o que levou o autor a concluir que a vigilância efectuada por rotina pelas autoridades aos produtores de carne deveria incluir testes à água fornecida aos animais. Salienta-se que neste estudo não foram realizados doseamentos do fármaco em amostras de fígado ou de músculo para se determinar o grau de contaminação.¹⁴

No âmbito da melhoria da performance desportiva, o clenbuterol esteve envolvido em diversos casos mediáticos, tal como o de Alberto Contador, que perdeu o título de vencedor do “Tour de France” de 2010 por lhe ter sido detectada a presença dessa substância na urina, vindo também anulada a sua vitória subsequente no “Giro d’Italia” de 2011.

6.1. Efeitos hipertróficos

Existe evidência forte, quer *in vitro* quer *in vivo*, de que os agonistas β têm um efeito profundo sobre o músculo esquelético e de que são potentes promotores do crescimento e da hipertrofia muscular em diferentes espécies de animais.¹⁵ Diversos estudos demonstraram que quando administrados em doses elevadas (muito superiores às equivalentes doses terapêuticas em humanos), os agonistas β provocavam um aumento do peso muscular em diversas espécies animais que podia chegar a 10-25% em curtos espaços de tempo (10-20 dias).^{8,16}

De facto, ratos expostos a clenbuterol durante 1 a 2 semanas sofreram um aumento de 10-20% da massa muscular, enquanto que cordeiros aos quais foi administrado cimaterol durante 3 meses viram o peso de diversos músculos sofrer aumentos de 25 a 30%. Em certos estudos, o peso do tricípede sural de cordeiros chegou a sofrer aumentos de peso de, aproximadamente, 40%.¹⁶ Emery expôs ratos a clenbuterol e a fenoterol durante 16 a 19 dias, tendo observado um aumento do conteúdo proteico corporal em 50 e 18%, respectivamente, e hipertrofia do músculo esquelético (gêmeos) com elevação da síntese proteica muscular *in vivo*.¹⁷ Noutro estudo, Rockwell e Stock demonstraram que a administração de clenbuterol a ratos sob dietas hipo e normoproteicas aumentava o *ratio* de proteína corporal total para gordura corporal em mais de 50%, ajudando a conservar a massa muscular.¹⁸

Num estudo recente, Sirvent administrou 4mg/kg de clenbuterol ou de soro fisiológico (controlo) a ratos Male Wistar durante 21 dias. Verificou que o músculo longo extensor dos dedos dos animais tratados hipertrofiava, havendo um aumento da força exercida pelo músculo. Contudo, observou também que, neste grupo, ocorria uma diminuição da resistência à fadiga.¹⁹

Este efeito de crescimento muscular foi também observado em cordeiros. Hamby administrou por via oral clenbuterol a um grupo destes animais ao longo de 40 dias e comparou a sua composição corporal com animais controlo. Enquanto que nos cordeiros não tratados com o fármaco a área de secção transversal do músculo “longissimus” aumentava 12% e a espessura da gordura subcutânea se mantinha inalterada, os cordeiros tratados com o agonista β_2 apresentavam um aumento de 48% e diminuição de 88%, respectivamente.²⁰ Noutro estudo, foram avaliados 16 cordeiros randomizados para receber 0 ou 4ppm de um agonista β , tendo-se encontrado um aumento de 18,6% no peso dos bicípedes femorais nos animais tratados, face aos animais controlo.²¹

Efeitos semelhantes foram observados em novilhos Angus, que sofreram aumentos de dimensão e de área de corte seccional de 25% e 28% face aos controlos, respectivamente.²² (Tabela 2)

Estudo	Fármaco	Duração da Administração	Animal	Efeito
Emery et al ¹⁷	Clenbuterol Fenoterol	16-19 dias	Rato	> 18-50% conteúdo proteico corporal; Hipertrofia muscular
Rockwell et al ¹⁸	Clenbuterol	21 dias	Rato	> 50% ratio proteína/gordura corporal
Sirvent et al ¹⁹	Clenbuterol	21 dias	Rato	Hipertrofia muscular; > força; < resistência à fadiga
McElligott et al ¹⁶	Clenbuterol	1 semana	Rato	> 15-23% peso muscular
McElligott et al ¹⁶	Clenbuterol	Intermitente	Rato	> 14-22% peso muscular
Hamby et al ²⁰	Clenbuterol	40 dias	Cordeiro	> 48% massa muscular; < 88% gordura subcutânea
Koohmaraie et al ²¹	L644,969	6 semanas	Cordeiro	> 18,6% peso bíceps femoral; > [proteína] e [RNA], < [DNA] muscular
Beermann et al ^{16,31}	Cimaterol	7 ou 12 semanas	Cordeiro	> 27,1-32,8% (7s) e 22-24% (12s) peso, > 26% (7s) e 32%(12s) área seccional musculares; > 30-35% [proteína] e [RNA] e < 22% [DNA] muscular
Kim et al ¹⁶	Cimaterol	8 semanas	Cordeiro	> 29% peso corporal; > 50% área seccional muscular
Schiavetta et al ²²	Clenbuterol	50 dias	Novilhos Angus	> 25% peso; > 28% área seccional musculares

Tabela 2: Efeito da administração de agonistas β em animais

6.2. Efeitos Celulares

Os agonistas β , e em particular os mais potentes (como o clenbuterol), são referidos na literatura como fármacos distributivos. De um modo simples, as substâncias farmacológicas são assim classificadas quando apresentam capacidade de alterar a composição corporal, ao reduzir a matéria gorda e ao aumentar a massa muscular (dita “magra”).^{23,24}

A acção destes fármacos é específica para qualquer tecido que expresse receptores β_2 . Contudo, os seus efeitos parecem ser mais fortes no tecido adiposo e nos músculos estriado, esquelético e cardíaco.^{16, 24}

O crescimento muscular parece dever-se a hipertrofia muscular “verdadeira”, à custa do crescimento de cada fibra muscular, dado que os fenómenos de hiperplasia e de multiplicação de células satélites (isto é, células de suporte da matriz extracelular) não estão associados aos aumentos de conteúdo proteico muscular observados

sistematicamente. Além disso, não se verificou que aqueles fenómenos precedessem o crescimento da massa muscular observado nos diversos modelos animais.¹⁶ Maltin demonstrou também um aumento do conteúdo proteico, de RNA e da taxa fraccional de síntese proteica após a administração de clenbuterol (em músculos inervados e na maioria dos músculos desinervados), o que veio sustentar esta hipótese. Este efeito pode também ser específico para cada tipo de músculo.²⁵ Do mesmo modo, concentrações superiores de proteína e de RNA e inferiores de DNA foram detectados em cordeiros tratados com clenbuterol (sugestivo de hipertrofia muscular e não de hiperplasia).²¹

Pelo contrário, os mesmos efeitos não se verificaram sobre o músculo liso, o fígado e o rim, sendo que o clenbuterol, quando administrado em doses de 10-200 ug/kg/dia, pareceu reduzir o crescimento de tecidos hepático e renal em ratos.^{16,24}

Como fármaco distributivo, verificou-se que cavalos tratados com 2,4 ug/kg de clenbuterol duas vezes por dia ao longo de 2 semanas, apresentavam perdas de massa gorda corporal de 20kg quando exercitados, e de 15kg quando tratados apenas com o fármaco. Estas perdas foram mantidas ao longo do estudo, embora com uma atenuação progressiva até valores não representativos.^{24,26} Outro estudo semelhante, no qual os cavalos haviam sido tratados com 3,2 ug/kg uma vez por dia, reportou uma diminuição contínua da percentagem de gordura corporal (o que pode ser devido à utilização de doses mais elevadas em posologias únicas diárias).²⁴ Estes achados estão em linha com a descoberta de concentrações alteradas de citocinas específicas do tecido adiposo nestes animais, com um aumento da adiponectina (envolvida na regulação da glicemia e da lipólise) e diminuição da leptina (influencia o balanço energético ao diminuir o apetite).²⁴

6.3. Efeito sob exercício físico

A utilização dos agonistas β poderá apresentar diferentes efeitos na distribuição da massa corporal se estes forem administrados em conjunto com actividade física intensa. Verificou-se na mesma espécie que a massa muscular sofria um aumento significativo, sobretudo em animais não exercitados, o que sugere que o clenbuterol e o exercício físico têm um efeito sinérgico na redução de massa gorda e antagónico no aumento da massa muscular.^{24,26} Resultados semelhantes foram evidenciados por Mounier, cujos

estudos demonstraram hipertrofia muscular superior em ratos não exercitados e tratados com clenbuterol, mas perdas de massa gorda superiores nos ratos exercitados e tratados com o fármaco.²⁵ (Fig.6)

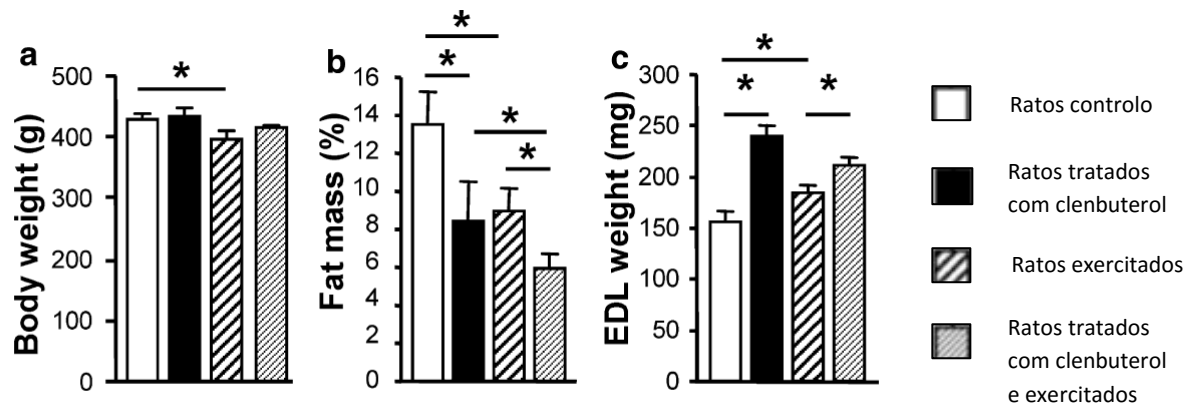


Figura 6: Peso corporal, percentagem de massa gorda e peso do músculo *extensor digitorum longus* de ratos após 8 semanas de protocolo: a redução na percentagem de massa gorda foi superior nos ratos exercitados e tratados com clenbuterol enquanto que o aumento do peso do músculo foi superior nos ratos apenas tratados com clenbuterol.²⁵

6.4. Efeito específico sobre os diferentes tipos de fibras musculares

O efeito destas substâncias no músculo é dependente do tipo de músculo (de contracção rápida ou de contracção lenta) e do seu estado de inervação (inervado ou desinervado).²⁴

A maioria dos músculos esqueléticos possuem um conjunto de diferentes fibras musculares em *ratios* distintos, associadas com o grau de trabalho aeróbico ou anaeróbico que é executado pelo músculo. As fibras musculares podem assim ser classificadas em:

- *Tipo I* ou *oxidativas lentas*: fibras aeróbicas com metabolismo oxidativo e muito ricas em mitocôndrias, mioglobina e complexos citocrômicos. São unidades motoras de contracção lenta e são resistentes à fadiga e, por isso, estão optimizadas para exercício de resistência. Contudo, geram menos tensão muscular que as fibras de tipo *II*. Encontram-se tipicamente nos músculos dos membros de mamíferos e nos músculos do peito de aves migratórias. No ser humano, são as fibras principais nos músculos das costas, estando especialmente adaptadas à contracção lenta e prolongada necessária para manter o ortostatismo.

Os músculos de atletas de desportos de alta resistência (como os maratonistas) são constituídos por uma elevada percentagem destas fibras.²⁷

- *Tipo II*: fibras de contracção mais rápida e com metabolismo glicolítico e oxidativo. Estas são subdividem-se em:
 - *Ila* ou *glicolíticas oxidativas*: fibras intermédias aeróbicas e anaeróbicas com metabolismo misto glicolítico e oxidativo. Têm uma dimensão média, muitas mitocôndrias e um elevado conteúdo de mioglobina. São unidades motoras de contracção rápida, são resistentes à fadiga e geram uma elevada tensão muscular máxima e, por isso, têm elevada adaptabilidade ao treino efectuado. Os músculos de velocistas de 400 a 800 metros, de nadadores de distâncias médias e de jogadores de hóquei têm uma elevada percentagem destas fibras.²⁷
 - *Ilb* ou *glicolíticas rápidas*: fibras anaeróbicas com metabolismo altamente glicolítico. Têm uma dimensão superior e menos mitocôndrias e mioglobina que os outros tipos de fibras. São as unidades motoras de contracção mais rápida, com maior propensão à fadiga e geram uma elevada tensão muscular máxima.²⁷ Estão, por isso, optimizadas para exercício balístico e de *sprint*.^{16,24} Os músculos de velocistas de distâncias curtas e halterofilistas têm uma elevada percentagem destas fibras.²⁷

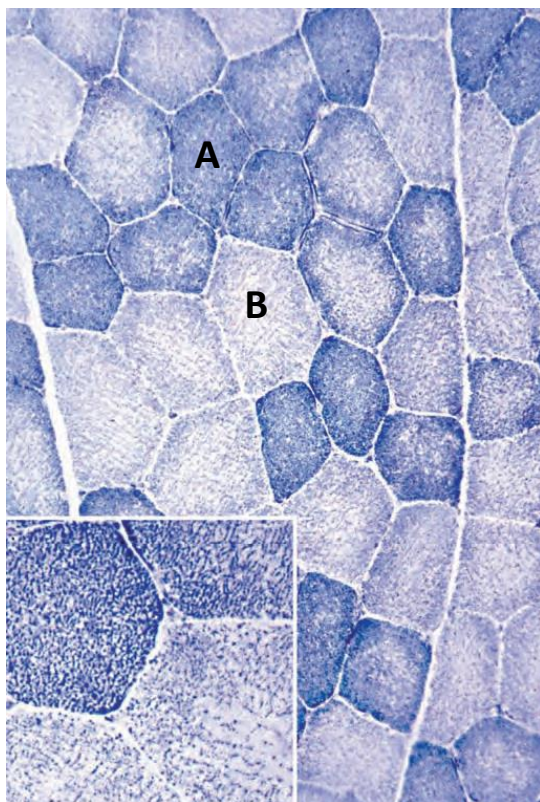


Figura 7: Corte transversal de músculo esquelético corado pela reacção de NADH-TR (realça enzimas oxidativas nas mitocôndrias).²⁷

As fibras musculares de menor diâmetro, profundamente coradas, apresentam uma forte actividade de enzimas oxidativas e correspondem às fibras oxidativas do tipo I (A). As fibras musculares de maior diâmetro, coradas numa tonalidade mais clara, correspondem às fibras glicolíticas rápidas do tipo IIb (B).

A administração de agonistas β demonstrou um efeito hipertrofiante quer em músculos compostos maioritariamente por fibras de tipo I quer por fibras de tipo II, como o solhar e o longo extensor dos dedos, respectivamente.¹⁶ Contudo, parece existir uma acção preferencial de certos agonistas β , como o clenbuterol, sobre músculos maioritariamente compostos por fibras de tipo II.^{8,24} A literatura divide-se quando se discute o efeito do fármaco sobre cada tipo e subtipo específico de fibra e a sua contribuição para a hipertrofia do músculo na sua globalidade.⁸

No que diz respeito ao efeito sobre as fibras II, a administração de agonistas β está consistentemente ligada a um aumento de 10-50% da área de secção destas fibras em ratos e cordeiros.¹⁶

Zeman reportou um efeito hipertrófico do fármaco sobre o músculo solhar de ratos à custa das fibras II (com áreas de corte seccional superiores em 40%), sem alteração nas fibras I, e hipertrofia à custa das fibras I e II no longo extensor dos dedos na ordem dos 23% e 63%, respectivamente.^{16,28} Simultaneamente, administrou butoxamina (antagonista β_2) a outro grupo de roedores, tendo as suas fibras de tipo I reduzido de dimensões. O clenbuterol provocou um aumento do *ratio* de fibras II-fibras I enquanto que o contrário se verificou com a butoxamina.²⁸

Um estudo realizado por Maltin revelou um aumento do peso do músculo solhar devido ao crescimento de fibras IIa e I e um ganho de peso do longo extensor dos dedos, embora este último sem crescimento das fibras musculares.^{16,29} O mesmo investigador já havia reportado em estudo prévio um aumento da dimensão das fibras de tipo I no músculo solhar de ratos aos quais havia sido administrado clenbuterol (com um efeito maior ao 4º dia do que ao 21º), contudo sem alteração na proporção das diferentes fibras musculares nesse músculo. No longo extensor dos dedos havia-se verificado uma diminuição das fibras IIa e um aumento das IIb.^{16,30} (Fig.7)

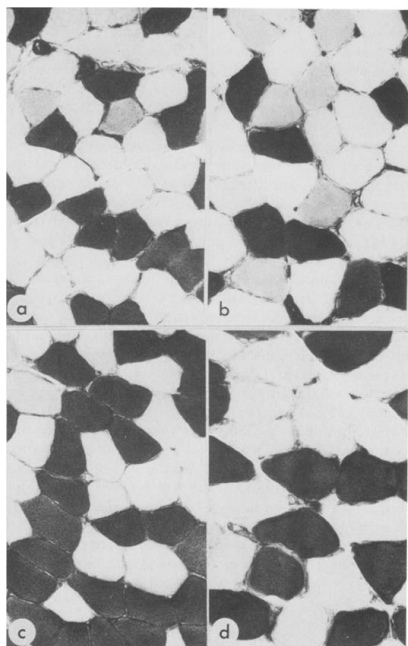


Figura 8 : Secção transversal do músculo solhar de rato com coloração para Ca^{2+} -ATPase, permitindo distinguir as fibras de tipo I (preto) e as fibras de tipo II (branco).³⁰

- A.** Músculo de rato com dieta controlo sem estímulo hipertrófico (tenotomia ou clenbuterol). Não se observam alterações hipertróficas.
- B.** Músculo de rato com dieta controlo com um estímulo hipertrófico (tenotomia). Observa-se hipertrofia das fibras de tipo I e de tipo II
- C.** Músculo de rato com dieta rica em clenbuterol sem tenotomia. Observa-se hipertrofia das fibras de tipo I e de tipo II.
- D.** Músculo de rato com dieta rica em clenbuterol e submetido a tenotomia. Observa-se hipertrofia de ambos os tipos de fibra muscular em magnitude superior à observada nas outras preparações (clenbuterol e tenotomia têm um efeito aditivo).

Beermann observou hipertrofia de ambas as fibras tipo I e tipo II, em magnitude semelhante, dos músculos bicípede femoral, semimembranoso e semitendinoso, em cordeiros alimentados com cimaterol por 7 ou 12 semanas. Observou também que o efeito era superior às 7 semanas e que ocorria um declínio da percentagem de fibras tipo I. Contudo, o mesmo investigador não demonstrou efeitos sobreponíveis num estudo subsequente.^{16,31}

Na mesma linha de investigação, outros estudos revelaram que a administração de agonistas β pode produzir transições de fibras musculares de contração lenta para um predomínio de fibras de contração rápida, principalmente em músculos com maior densidade destas fibras de tipo I, tal como evidenciado por Dodd.^{8,24,32} Além disso, parece ser também possível existir uma transição entre subtipos específicos de fibras de tipo II, tendo vários estudos demonstrado uma conversão de fibras IIa (de metabolismo glicolítico e oxidativo) para fibras de tipo IIb (com metabolismo essencialmente glicolítico) no longo extensor dos dedos de ratos, sem alterações das dimensões das fibras individuais e do músculo na sua totalidade.^{8,30} (Tabela 3)

6.5. Alterações nas propriedades contrácteis

Estas alterações na composição muscular provocam mudanças nas propriedades contrácteis. Verificou-se um aumento no pico da tensão de contracção e na tensão tetânica máxima no músculo solhar de ratos, com resultados sobreponíveis no longo extensor dos dedos. Além disso, ocorreu também uma alteração na velocidade de contracção, com aumento da velocidade de encurtamento (18%) e de relaxamento muscular. A hipertrofia muscular induzida pelo clenbuterol causou um aumento de 14% na tensão muscular, observando-se ainda nestes ratos diminuição do tempo decorrido até à fadiga (menos 18%).^{24,32}

Esta transição entre os tipos de fibras musculares tipo I > tipo IIa > tipo IIb parece ser o contrário do que ocorre em cavalos em resposta a treino aeróbico, sendo que as alterações na proporção de fibras musculares parecem ser deletérias para a performance deste tipo de exercício ao transformar um fenótipo apropriado para exercícios de resistência num fenótipo adequado a exercícios balísticos e de *sprint*.²⁴

Também em ratos, Ingalls comprovou que embora a administração de clenbuterol tivesse efeitos anabólicos no músculo, tinha também efeitos deletérios no trabalho total executado (menos 25%) e anulava os efeitos positivos do regime de treino sobre o trabalho executado.³³ Duncan reportou que ratos tratados com este fármaco apresentavam reduções de 57% em distância percorrida e não conseguiam completar protocolos de *sprint* e de natação face aos ratos controlo. Além disso, diversos ratos tratados apresentavam hipertrofia cardíaca significativa e infiltração de colagénio no miocárdio, tendo três morrido de morte súbita.³⁴ (Tabela 3)

É duvidoso que o clenbuterol tenha efeitos positivos sobre a performance do exercício físico. No entanto, tal pode estar relacionado com o tipo de exercício físico a que os sujeitos tratados com esta classe de fármacos estão expostos, podendo ser desvantajoso para exercícios de resistência e vantajoso para exercícios balísticos e de força.

Estudo	Fármaco	Duração da Administração	Animal	Efeito
Zeman et al ^{16,28}	Clenbuterol Butoxamina	8-12 semanas	Rato	Hipertrofia muscular com > <i>ratio</i> fibras II/fibras I; contrário com butoxamina
Maltin et al ^{16,30}	Clenbuterol	11 dias	Rato	> fibras I no solhar; < fibras IIa e > fibras IIb no longo extensor dos dedos
Maltin et al ^{16,29}	Clenbuterol	7 dias	Rato	Hipertrofia das fibras I e IIa do músculo solhar
Beermann et al ^{16,31}	Clenbuterol	7 ou 12 semanas	Rato	Hipertrofia das fibras I e II em vários músculos (superior às 7s)
Dodd et al ^{8,24,32}	Clenbuterol	14 dias	Rato	> <i>ratio</i> fibras II/fibras I e <i>ratio</i> fibras IIb/fibras IIa > 14% na tensão, > 18% na velocidade de encurtamento e < 18% no tempo até à fadiga
Ingalls et al ³³	Clenbuterol	8 semanas	Rato	< 25% no trabalho total
Duncan et al ³⁴	Clenbuterol	16-20 semanas	Rato	< 57% em distância percorrida Hipertrofia cardíaca e infiltração por colagénio

Tabela 3: Efeitos da administração de agonistas β na composição muscular e na *performance* funcional de animais.

6.6. Efeito farmacológico a longo prazo

O efeito, já referido, de perda da eficácia do fármaco com a sua administração contínua vem suportar estudos efectuados em roedores que apontavam para a atenuação da resposta ao fármaco com o passar do tempo.

Estes demonstraram que o início da actividade anabólica se observava rapidamente após 2 dias de administração de clenbuterol a ratos e atingia um pico de resposta ao fim de 8 dias, evidenciado por uma taxa aumentada de ganho de peso corporal e aumento das dimensões musculares, sendo que o efeito parecia ser atenuado após 14 dias de exposição ao fármaco (aproximando-se do ganho diário dos ratos controlo). Contudo, o ganho prévio era aparentemente retido.¹⁶ A atenuação da resposta foi também prevenida pela administração do fármaco em regimes cíclicos de 2 dias, podendo estar relacionada com a dessensibilização dos receptores β .¹⁶

7. Por que mecanismo actuam os agonistas β_2 ?

7.1. Hipertrofia ou inibição de atrofia?

Os efeitos anabólicos da administração sistémica de agonistas β_2 estão associados a um aumento do conteúdo proteico do músculo esquelético, e embora não esteja completamente esclarecido se tal se deve a um aumento da síntese ou a uma diminuição da degradação proteica, para este efeito parece contribuir essencialmente a inibição de vias de sinalização atroficas.^{6,11,24}

Num estudo recente, Wannenes avaliou os efeitos de agonistas adrenérgicos de curta e de longa duração sobre uma linha celular de músculo esquelético sendo que nenhum dos fármacos usados demonstrou efeito sobre a expressão de receptor β_2 ou de genes/proteínas associadas a hipertrofia. Pelo contrário, o clenbuterol demonstrou provocar dessensibilização dos marcadores de atrofia testados, embora o mesmo não se tenha verificado com outros fármacos avaliados.¹¹

7.2. Mecanismos directos ou indirectos?

Como já foi mencionado previamente, é claro que os agonistas β provocam efeitos marcados no músculo esquelético. Todavia, coloca-se a questão se estes ocorrem por acção directa sobre o *turnover* proteico ou sobre outros factores que criem um ambiente favorável a estes fenómenos, tendo sido ao longo do tempo vários os mecanismos propostos.¹⁶

Um desses mecanismos possíveis derivou do facto da libertação de insulina pelo pâncreas ser estimulada pela administração aguda de agonistas β , embora os seus níveis tendam a normalizar ou mesmo a diminuir com a cronicidade do tratamento. Não obstante ter-se verificado que o crescimento muscular era fortemente estimulado pela administração de agonistas β em ratos diabéticos tratados com insulina, o mesmo aconteceu em ratos gravemente diabéticos não tratados com insulina. Deste modo, este mecanismo não parece ser responsável pela hipertrofia muscular observada.¹⁶

Também a secreção de hormonas pituitárias não parece estar relacionada com o efeito destes fármacos, dado que o crescimento muscular em ratos hipofisectomizados foi superior quando tratados com um agonista β . Não existem alterações consistentes

reportadas na literatura nos níveis circulantes de hidratos de carbono ou de glicocorticóides após administração de agonistas β , enquanto que os níveis de Factor de Crescimento da Insulina (*Insulin Growth Factor-1* ou IGF-1) reduziram e os de hormona tiroideia aumentaram. Do mesmo modo, as hormonas sexuais não parecem estar implicadas neste processo dado que os efeitos se fazem sentir eficazmente em ratos macho e fêmea e em ratos castrados.^{16,23}

A administração aguda de agonistas β provoca vasodilatação periférica, em especial no território vascular muscular, o que poderia aumentar o aporte de substratos. Contudo, embora aumente a taxa de fluxo sanguíneo e o *uptake* de oxigénio em músculos de ratos e de outros animais, este efeito é mitigado ao longo do tempo, podendo mesmo tornar-se inferior ao basal com a administração crónica.¹⁶

Os dados actualmente existentes não suportam um efeito indirecto por parte destes agentes farmacológicos.^{16,23} Além disso, estudos com infusão arterial fechada destes fármacos em membros isolados de novilhos vieram valorizar a importância da sua acção directa nos resultados observados. Esta experiência permitiu verificar que em membros infundidos com cimaterol durante 21 dias ocorria um aumento do conteúdo proteico de 65% juntamente com hipertrofia muscular e aumento do peso muscular, quando comparado com membros infundidos com soro fisiológico.^{23,35}

7.3. Mecanismo de acção molecular e transducção de sinal

O músculo esquelético contém uma elevada proporção de receptores adrenérgicos β , na sua grande maioria β_2 , embora existam 7-10% de receptores β_1 . Além disso, apresenta ainda uma pequena população de receptores adrenérgicos alfa (encontrados maioritariamente em fibras musculares de tipo I).⁸

As fibras musculares de tipo I apresentam uma densidade de receptores β aproximadamente 2,0 vezes superior à das fibras IIa e 3,2 a 4,5 vezes superior à das fibras IIb (fibras IIb profundas e superficiais, respectivamente). Assim sendo, músculos constituídos predominantemente fibras de tipo I, como o solhar, têm um conteúdo tecidular total de receptores β cerca de 3 vezes superior ao de músculos formados essencialmente por fibras de tipo IIb^{8,36}. Contudo, a resposta à administração de β -agonistas aparenta ser superior em músculos com fibras musculares de tipo II.⁸

Como já foi referido previamente, o receptor β_2 encontra-se ligado à Proteína Gs. A sua activação por um agonista leva à cisão da Proteína G nos seus componentes; a fracção α ligada ao GTP vai estimular a via da adenilato-ciclase (AC), a qual leva à formação de cAMP. Por sua vez, o dímero $\beta\gamma$ da mesma proteína inicia outras vias de sinalização independentes. (Fig.8)

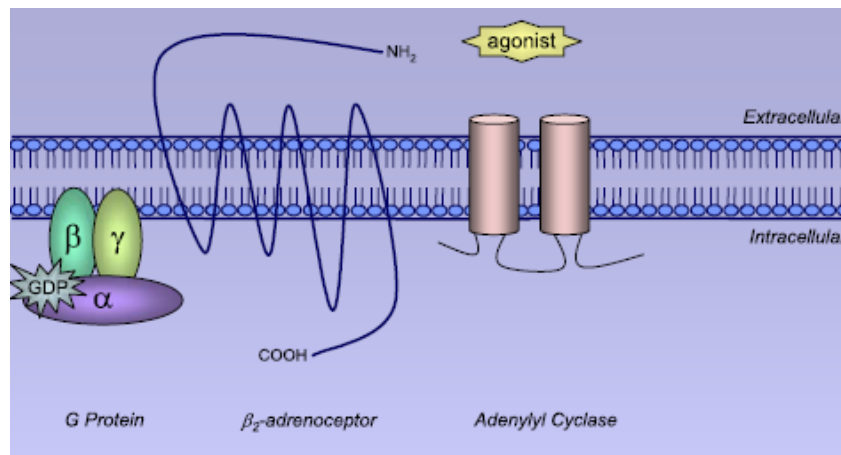


Figura 8: Componentes da via de sinalização básica do receptor β_2 : receptor β_2 , proteína G e Adenilato Ciclase.⁸
(GDP, guanina difosfato)

7.3.1. Via da $G_{\alpha s}$ -AC-cAMP

Esta via de sinalização é a melhor caracterizada na sinalização mediada pelo receptor β_2 e pensa-se que seja responsável, pelo menos em parte, pela hipertrofia muscular secundária à acção de agonistas deste receptor.⁸

A adenilato-ciclase cataliza a conversão do ATP em cAMP, existindo nove isoformas diferentes da molécula ligadas à membrana plasmática (AC1 a AC9) e uma forma solúvel (sAC). No músculo esquelético, encontram-se presentes predominantemente as isoformas AC2 e AC9. Cada uma das AC apresenta um nível de actividade basal que pode ser aumentado pela ligação de uma subunidade $G_{\alpha s}$ (ou inibida pela ligação a uma subunidade $G_{\alpha i}$, podendo ainda sofrer influência por parte de outros factores como o dímero $\beta\gamma$).⁸

O cAMP produz os seus efeitos mediante a activação de várias vias de sinalização subsequentes, sendo a mais conhecida a ligada à Proteína Cinase A (PCA), a qual é a molécula efectora mais estudada do cAMP. A PCA é constituída por duas subunidades

catalíticas (C) ligadas reversivelmente a um dímero regulador (R) formando um complexo tetramérico (R_2C_2), sendo que cada um destes componentes tem várias isoformas, determinando a sua localização celular e a afinidade de ligação ao cAMP.

Quando a concentração de cAMP é baixa, a PCA está inactiva. Quando a AC é activada e a concentração de cAMP aumenta, duas moléculas de cAMP ligam-se a cada unidade R, determinando uma modificação na sua conformação, a qual diminui a sua afinidade para as subunidades C, causando a sua activação. Por sua vez, as subunidades C activadas fosforilam resíduos de serina e de treonina de determinados substratos proteicos específicos, nomeadamente enzimas metabólicas, proteínas de transporte e numerosas enzimas reguladoras, incluindo outras proteínas cinases, canais iónicos e factores de transcrição, dependendo a sua acção dos distintos substratos proteicos que são expressos em cada tipo celular.

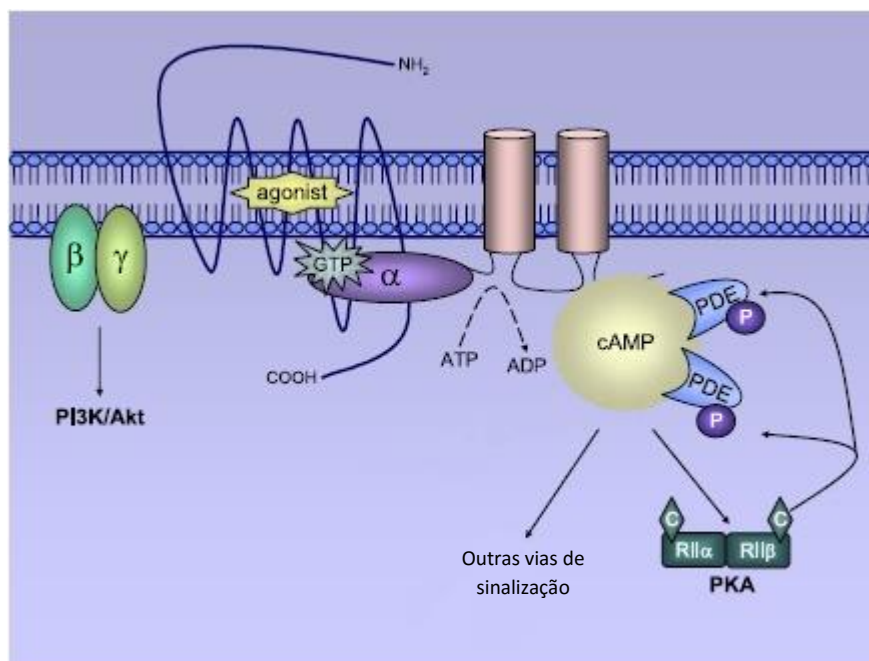


Figura 9: Via da Adenilato Ciclase: a AC, previamente estimulada pela subunidade α s da Proteína G, cataliza a conversão do ATP em cAMP que, por sua vez, activa a PCA e outras vias de sinalização ⁸
(PKA, Proteína Cinase A (PCA); PDE, fosfodiesterases; PI3K/Akt, fosfoinositol 3-cinase/serina-treonina cinase; cAMP, adenosina monofosfato cíclica; ATP, adenosina trifosfato; ADP, adenosina difosfato; GTP, guanina trifosfato)

7.3.2. Efeitos da activação da PCA no músculo esquelético

O aumento da activação de PCA vai actuar maioritariamente a dois níveis: na regulação da sinalização intracelular pelo cálcio (intervindo sobre a contracção muscular) e no crescimento e hipertrofia do músculo esquelético.⁸

Na primeira situação, a contracção muscular inicia-se com a libertação exocítica de acetilcolina (Ach) pelo neurónio motor para a fenda sináptica, na junção neuromuscular, estimulada pelo potencial de acção proveniente do SNC. As moléculas de Ach ligam-se a canais de sódio (Na^+) na membrana muscular, permitindo o influxo de Na^+ para o interior da célula muscular, propagando o potencial de acção ao longo da membrana plasmática e dos túbulos T. (Fig.10)

Com a propagação do potencial de acção, canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem são activados e permitem o transporte de cálcio do retículo sarcoplasmático para o citoplasma (canais designados por RyRs).

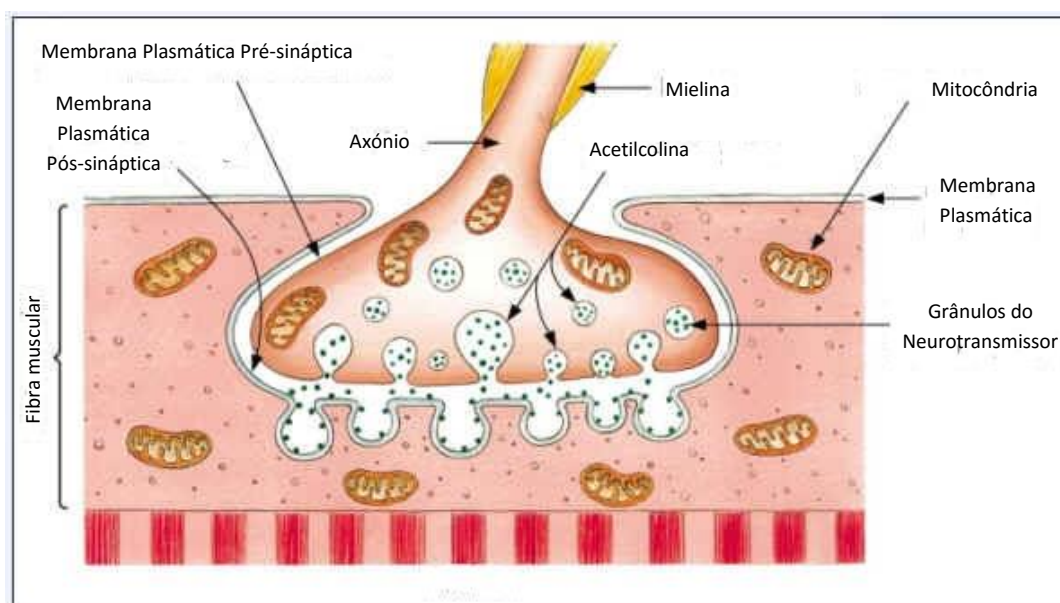


Figura 10: Junção Neuromuscular: a acetilcolina libertada pelo neurónio motor na fenda sináptica actua sobre a membrana plasmática da fibra muscular, despolarizando-a.³⁷

A PCA, já referida como a principal molécula efectora do cAMP, encontra-se ligada a estes canais, sendo que a sua activação provoca a fosforilação do RyRs, facilitando a abertura do canal. Assim, actua potenciando a contracção muscular mediada pela acção do cálcio e permitindo a formação de complexos entre o cálcio e outras proteínas

sinalizadoras no citoplasma.⁸ Esta via poderá explicar os efeitos aditivos sob as propriedades contrácteis e a performance funcional com a administração de agonistas β . Por fim, a subunidade C desta proteína pode ainda inibir a acção de enzimas proteolíticas dependentes de cálcio, as calpaínas.⁸ (Fig.11)

Além deste primeiro modo de acção, as subunidades C da PCA podem difundir-se passivamente em direcção ao núcleo, onde vão regular a expressão génica. Tal inicia-se pela fosforilação directa da “proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP” (*cAMP response element-binding protein* - CREB) ou via um modulador. (Fig.11)

Esta proteína CREB é um factor promotor de transcrição nuclear envolvido em processos de proliferação, de diferenciação, de adaptação e de sobrevivência celulares. O CREB recruta a “proteína de ligação do CREB” (CBP), que é uma histona acetiltransferase que interage com a RNA polimerase II (POLII) e leva ao aumento da transcrição de genes contendo nas suas regiões promotoras o “elemento de resposta ao cAMP” (*cAMP response element motif* – CRE). Um destes genes designa-se por NOR-1 e o aumento da sua expressão está associado à diminuição dos níveis de miostatina (um regulador negativo da massa muscular), podendo promover o crescimento muscular. Outras acções da proteína PCA podem também estar implicadas, incluindo a activação de outros factores de transcrição como o factor potenciador do miócito 2 (*myocyte enhancer factor 2* - MEF2).⁸

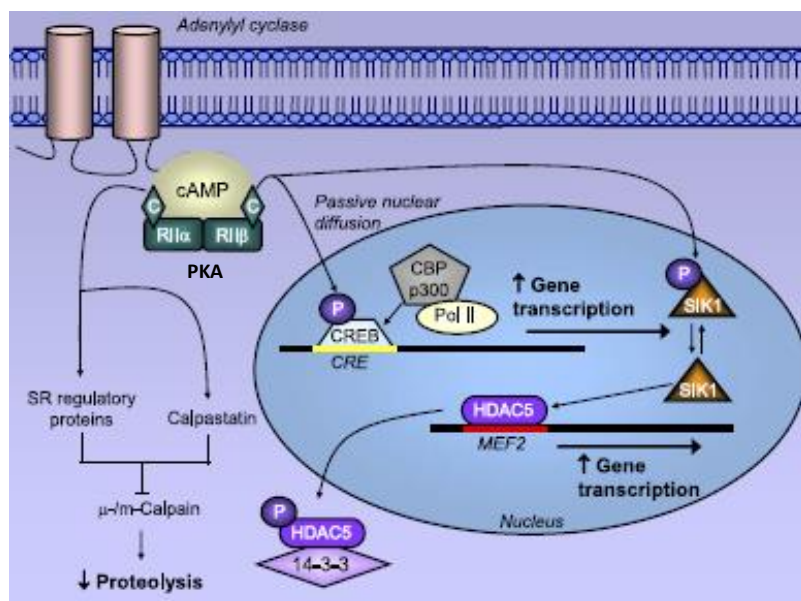


Figura 11: Via de sinalização da PCA: as subunidades C difundem-se para o núcleo, onde fosforilam a CREB que, recrutando a CBP, aumenta a transcrição de vários genes e de factores de transcrição.⁸

(cAMP, adenosina monofosfato; CREB, proteína de ligação ao elemento de resposta do cAMP; MEF2, factor melhorador do miócito 2; PKA: PCA)

7.3.3. Vias de sinalização independentes da PCA

Além da via G α s-AC-cAMP, também as subunidades G $\beta\gamma$ aparentam ter relevância na activação de vias de sinalização importantes para o efeito da activação β -adrenérgica no músculo esquelético. Estas subunidades estão implicadas na activação da via PI3K-AKT, que está envolvida na síntese proteica, na transcrição génica, na proliferação e na sobrevivência celulares, levando a uma resposta predominantemente hipertrófica (que inclui a activação da *mammalian target of rapamycin* ou mTOR).⁸ (Fig.12)

Além de envolvida em fenómenos de hipertrofia muscular, a sinalização PCB está associada à inibição de processos celulares responsáveis por atrofia muscular. Provoca a fosforilação e a inactivação da molécula *Forkhead box class O* (FOXO, responsável pela inibição da síntese proteica e da atrofia muscular), inibindo através dela a sinalização das moléculas *muscle-RING finger protein-1* (muRF1) e *muscle atrophy F-box* (MAFbx) e, em última análise, preservando tecido muscular.⁸ (Fig.12)

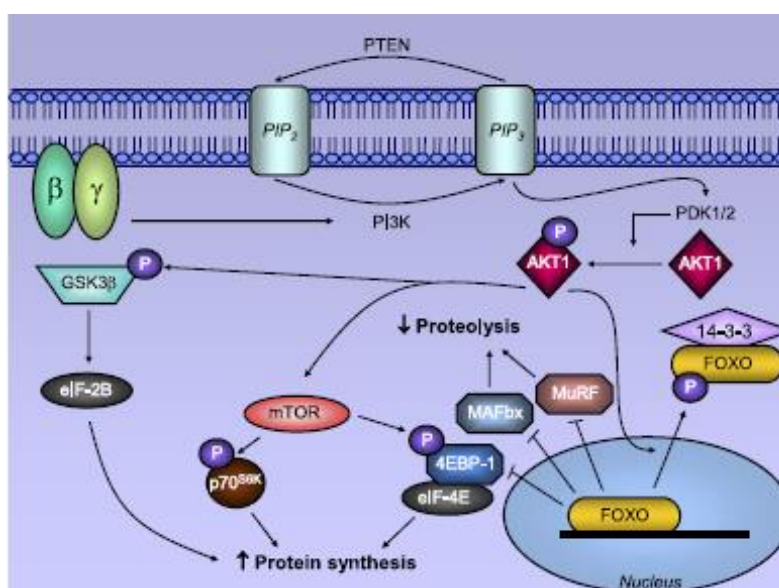


Figura 12: O papel das subunidades $\beta\gamma$ em vias de sinalização independentes da PCA: a estimulação da via PI3K-AKT provoca a activação de múltiplas proteínas (como a mTOR) responsáveis pelo aumento da síntese proteica e pela inibição do factor FOXO responsável por proteólise.⁸

(PI3K, fosfoinositol 3-quinase; AKT1, serina-treonina quinase 1; PIP₂, fosfatidilinositol bifosfato; PIP₃ fosfatidilinositol trifosfato; FOXO, forkhead box class O; muRF1, muscle-RING finger protein-1; MAFbx, muscle atrophy F-box)

Além dos mecanismos moleculares principais já descritos, existem outras proteínas e vias de sinalização potencialmente envolvidas na acção dos β -adrenérgicos sobre a

célula muscular. Contudo, devido à sua enorme complexidade e à dificuldade existente no seio da comunidade científica para precisar qual o seu contributo para a acção dos agonistas β -adrenérgicos no músculo, não serão abordados neste trabalho de revisão.

7.3.4. Regulação dos receptores

As respostas mediadas pela Proteína G aos fármacos e agonistas hormonais são frequentemente atenuadas com o tempo. Após atingir um nível inicial alto, a resposta diminui durante segundos ou minutos, mesmo na presença contínua do agonista. Essa “dessensibilização” é, com frequência, rapidamente reversível; uma segunda exposição ao agonista, se fornecida alguns minutos após a conclusão da primeira exposição, resulta numa resposta semelhante.

O mecanismo que medeia a rápida dessensibilização dos receptores acoplados à Proteína G envolve frequentemente a fosforilação do receptor. A mudança induzida pelo agonista na conformação do receptor faz com que ele se ligue, se active e sirva de substrato para uma família de cinases específicas do receptor chamadas “cinases do receptor acoplado à Proteína G” (G protein coupled receptor kinases – GRK). A GRK activada fosforila os resíduos de serina na extremidade do receptor com o terminal carboxilo. A presença de resíduos de serina fosforilados aumenta a afinidade do receptor para ligar uma terceira proteína, a β -arrestina. A ligação da β -arrestina aos *loops* citoplasmáticos do receptor diminui a capacidade do receptor de interagir com a Proteína Gs, reduzindo assim a resposta do agonista. Com a retirada do agonista, a activação da GRK é concluída e o processo de dessensibilização pode ser revertido pelas fosfatases celulares.

A ligação da β -arrestina também acelera a endocitose dos receptores a partir da membrana plasmática. A endocitose dos receptores promove a sua desfosforilação através de uma fosfatase do receptor que está presente numa concentração elevada nas membranas endossómicas e os receptores regressam então à membrana plasmática. Tal ajuda a explicar a eficiente capacidade de recuperação da resposta de sinalização mediada pelo receptor após a dessensibilização induzida pelo agonista. Se os receptores forem persistentemente activados, são transportados para lisossomas por endocitose e são degradados. Este processo atenua (e não restaura) a resposta celular.

Assim, dependendo da duração da activação, a endocitose pode contribuir ou para a recuperação rápida ou para a atenuação prolongada da resposta celular, justificando, pelo menos em parte, a diminuição da resposta muscular ao longo do tempo com a administração contínua do agonista e a manutenção da resposta com a administração a intervalos, verificada em alguns estudos. (Fig.13)

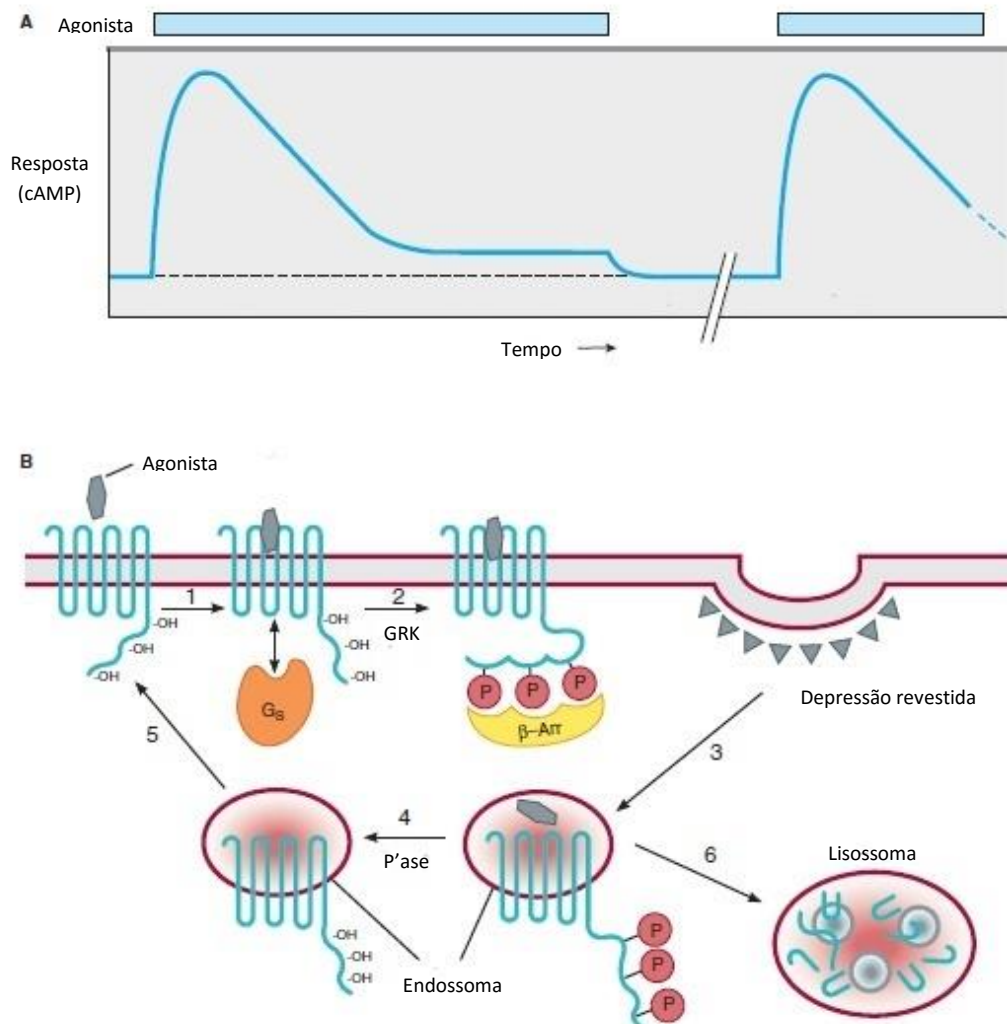


Figura 13: Regulação do receptor $\beta 2$ -adrenérgico.³⁸

- A.** Resposta à administração de um agonista (ordenada) *versus* tempo (abscissa). A exposição das células ao agonista (indicada pela barra de cor clara) produz uma resposta de cAMP. A dessensibilização refere-se à resposta reduzida ao cAMP após vários minutos na presença continuada do agonista. Se o agonista é removido após pouco tempo as células recuperam a capacidade completa de resposta a uma nova exposição. A resensibilização não ocorre completamente se a exposição ao agonista for muito prolongada ou repetida.
- B.** A ligação do agonista ao receptor inicia a sinalização intracelular ao promover a interação com a Proteína Gs localizada no citoplasma (seta 1). O receptor activado pelo agonista é fosforilado por uma “cinase do RLPG” (GRK), o que impede a interação do receptor com a Gs e promove a ligação de outra proteína, a β -arrestina (β -Arr), ao receptor (seta 2). O complexo receptor-arrestina liga-se a depressões revestidas o que promove a sua internalização (seta 3). A dissociação do agonista do receptor internalizado diminui a afinidade de ligação da β -arrestina, permitindo a desfosforilação do receptor por uma fosfatase (P'ase, seta 4) e o retorno do mesmo à membrana (seta 5). A exposição repetida ou prolongada ao agonista promove a degradação do receptor em lisossomas (seta 6).

8. A atracção dos agonistas β_2

Como já referido, devido aos efeitos potenciais broncodilatadores, anabólicos e anti-inflamatórios sobre o organismo humano e pela aparente ausência de risco cardiovascular acrescido, os agonistas adrenérgicos com selectividade β_2 apresentam-se como das substâncias mais tentadoras com vista ao aumento da performance desportiva.

Estes são usados terapeuticamente para o tratamento da asma e da asma induzida pelo exercício (AIE) devido à sua actividade broncodilatadora potente. Contudo, pelo receio da sua possível actividade ergogénica, o uso por atletas profissionais é actualmente proibido pela WADA (World Anti-Doping Agency), com excepção do salbutamol, do formeterol, do salmeterol e da terbutalina quando administrados sob a forma inalada e apenas se ao atleta tiver sido atribuída uma DUT.⁶ A requisição deste documento envolve um longo processo burocrático, sendo necessária a avaliação e a aprovação do processo por um painel médico independente.¹⁵ É sempre necessário o cumprimento de 3 requisitos para a sua atribuição: apenas se a remoção do fármaco for prejudicial à saúde do atleta, se a sua administração apenas restaurar a normal função fisiológica e não oferecer uma vantagem fisiológica e a inexistência de uma alternativa terapêutica válida.¹

Para a documentação de asma e/ou AIE ou broncoconstrição induzida pelo exercício, o Comité Olímpico Internacional considera apropriadas as seguintes provas:

- Teste de broncodilatação: um aumento de pelo menos 12% do FEV1, face aos valores basais, após a administração de um agonista β_2 inalado.
- Testes de provocação brônquica: teste de hiperpneia voluntária eucápnica, prova de esforço em laboratório ou no terreno, inalação de aerossol hipertónico e teste de metacolina.

Independentemente do atleta e da presença ou não da DUT, uma concentração urinária de salbutamol superior a 1000ng/ml é considerada um teste de doping positivo, dado que esta concentração não é passível de ser atingida apenas por inalação.¹⁵

9. Efeitos ergogénicos em humanos: o que sabemos?

Várias hipóteses foram colocadas para justificar o potencial ergogénico destas substâncias, tais como:

- Broncodilatação: com capacidade de aumentar o *uptake* ou consumo de O₂ (volume de O₂ - VO₂) e a performance em desportos de resistência, pelo aumento do aporte de O₂ aos tecidos periféricos.
- Efeitos musculares a curto prazo: por aumento da contractilidade e da força produzida, com particular interesse em actividades desportivas anaeróbicas (desportos de força ou de combate), ou aumentos transitórios do fluxo sanguíneo local (com menores tempos de recuperação muscular)
- Efeitos musculares a longo prazo: por estimulação do anabolismo e da hipertrofia muscular.

Os potencial ergogénico dos agonistas β_2 está dependente da dose e da via de administração, já que estes dois factores estão intimamente relacionados com a biodisponibilidade destes fármacos aos tecidos-alvo.³⁹ Outro factor essencial consiste na duração de administração, já que exposições agudas poderão exercer os seus efeitos por mecanismos diferentes de exposições crónicas. Por fim, importa considerar o tipo de actividade desportiva em causa, em função da qual poderá ser mais vantajoso utilizar uma via ou duração de administração em detrimento de outra.

9.1. Fármacos inalados

Até à data, todos os estudos efectuados com fármacos inalados avaliaram a resposta de atletas à administração aguda destas substâncias. Nenhum estudo parece ter sido efectuado avaliando a resposta subaguda ou crónica a esta via de administração.

Foram encontrados 20 estudos randomizados e controlados por placebo que estudaram o efeito de agonistas β_2 sobre a performance desportiva em atletas profissionais, não asmáticos, com funções pulmonares normais.^{15,39,40} Além disso, vários destes estudos abordaram os seus efeitos sob temperaturas negativas (para simular as condições climatéricas encontradas em desportos de inverno), 18 avaliaram atletas de resistência, um estudo incidiu sobre atletas em desportos de força e outro sobre atletas amadores.¹⁵

A maioria destes estudos foram conduzidos após a administração inalada de doses terapêuticas de salbutamol, embora a terbutalina, o salmeterol e o formeterol também tenham sido utilizados. Estes fármacos foram administrados, em média, 15 a 30 minutos antes do início do esforço.^{15,39,40}

Apenas três estudos demonstraram um efeito positivo sobre a performance desportiva. Signorile observou aumentos de potência máxima durante testes de *Wingate* (Fig.14) repetidos nos atletas tratados. Bedi verificou que o tempo máximo de ciclismo aumentou após a inalação de 180 µg de salbutamol, enquanto que van Baak obteve resultados semelhantes com doses supratrapêuticas de 800 µg de salbutamol.^{15,40} Contudo, em todos estes testes foram incluídos atletas amadores com menor aptidão física, sendo que a melhoria de resultados se observou sobretudo naqueles com pior performance (situação não observável em alta competição).¹⁵

Em todos os restantes estudos, os agonistas β inalados não apresentaram efeito sobre o VO_2 máximo, a potência anaeróbica, a performance em exercícios de força, nas concentrações de lactato sérico, sobre o cansaço subjectivo dos atletas e sobre a sua performance psicomotora. Em dois estudos, o tempo de corrida até à exaustão foi mesmo reduzido após a administração de salbutamol e de salmeterol. Mesmo doses elevadas de salbutamol não obtiveram efeitos ergogénicos em quatro estudos, nem alterações da performance desportiva sob temperaturas baixas ou condições hipobáricas.^{15,39,40}



Figura 14: Teste de *Wingate*: teste anaeróbico protocolado, realizado numa bicicleta estática, usado para medir a capacidade anaeróbica e a potência anaeróbica máxima.⁴¹

Assim, dada a ausência de efeitos ergogénicos descritos na literatura e de alterações de parâmetros fisiológicos utilizados para monitorizar os efeitos sistémicos provenientes da inalação destes fármacos (frequência cardíaca ou taxa metabólica), doses terapêuticas por esta via não parecem aumentar a performance desportiva, tendo apenas um efeito respiratório local. Contudo, os resultados positivos obtidos no estudo de Van Baak podem dever-se à biodisponibilidade sistémica aumentada pela utilização de uma dose elevada de salbutamol de 800 µg, sugerindo que doses supraterapêuticas poderão apresentar algum potencial ergogénico por esta via.

9.2. Fármacos Orais

Todos os estudos com fármacos *per os* foram conduzidos após a administração de doses terapêuticas de salbutamol (4-6 mg na administração aguda e 12-16 mg durante 2-6 semanas na administração subaguda).^{15,39}

No que diz respeito à administração aguda de agonistas β , Van Baak verificou uma melhoria significativa no rendimento em exercícios de ciclismo de intensidade submáxima a 70% do VO_2 máximo. Contudo estes resultados ocorreram em quatro indivíduos que acabaram por interromper o protocolo devido ao desenvolvimento de efeitos secundários. Collomp também encontrou melhorias significativas durante exercício a 80-85% do VO_2 máximo após a administração de 6mg de salbutamol (resultados não verificados numa prova subsequente).

Quanto ao exercício anaeróbico de elevada intensidade, Van Baak demonstrou que a força máxima dos extensores e dos flexores do joelho aumentava significativamente após a administração de 4mg de salbutamol. Também Collomp e Le Panse verificaram que existia um aumento significativo nas potências musculares máxima e média e uma diminuição significativa no intervalo de tempo decorrido até à potência máxima em homens e mulheres, num teste de *Wingate* de 30 segundos.³⁹

Do mesmo modo, durante a administração subaguda (2-6 semanas), os β agonistas demonstraram uma melhoria significativa na performance durante exercício aeróbico a 80-85% do VO_2 máximo e Martineu e Caruso verificaram inclusivamente um aumento da força muscular voluntária (potenciada por um programa de exercício adequado). Este último grupo de investigadores demonstrou que 16mg/dia de salbutamol oral durante 1

mês melhorava os resultados do treino ao reduzir perdas de força nos músculos extensores do tornozelo. Tal como nas administrações pontuais, ocorreu uma diminuição do intervalo de tempo até ao desenvolvimento da potência muscular máxima e de um aumento deste último parâmetro.³⁹ (Tabela 4)

Estudo	Fármaco e Dosagem	Duração da Administração	Participantes	Efeito
Van Baak et al ^{15,39}	Salbutamol 4mg	Aguda	16 homens amadores	> resistência (obtido em 4 participantes que desenvolveram efeitos adversos); > força máxima nos músculos da coxa; > fluxo expiratório máximo
Collomp et al ^{15,39}	Salbutamol 4mg	Aguda	13 homens amadores	> força máxima e força média; > resistência; Sem efeito aditivo
	6mg	Aguda	9 homens amadores	
	6mg	Aguda	8 homens amadores	
Le Panse et al ³⁹	Salbutamol 4mg	Aguda	12 mulheres amadoras	> força máxima e força média
Martineu et al ³⁹	Salbutamol 12mg	2-3 semanas	12 homens saudáveis	> força no quadríceps
Caruso et al ³⁹	Salbutamol 16mg	2 semanas	22 homens sob treino anaeróbico	> força > força
	16mg	6 semanas		

Tabela 4: Efeitos funcionais da administração de agonistas β por via oral a humanos.

No que diz respeito à administração oral, a evidência existente até à data da realização deste estudo aponta para que os agonistas β possuam potencial ergogénico no ser humano, efeito que poderá estar relacionado com a maior biodisponibilidade de fármaco ao músculo e que poderá ter uma magnitude superior em fármacos de acção longa.

Existem vários mecanismos propostos para este efeito de aumento da *performance* desportiva. As melhorias observadas durante exercício aeróbico submáximo/máximo poderão dever-se à estimulação do gasto energético por oxidação de hidratos de carbono (glicogenólise e gliconeogénese com aumento da libertação de glicose hepática, estimulação de glicogenólise e glicólise em tecidos periféricos) e dos lípidos (lipólise e

oxidação).³⁹ Também a hiperglicemia e hiperinsulinemia estão associadas à utilização destes fármacos. Porém, existem poucos dados na literatura acerca das suas implicações.³⁹ Embora sem relação causal comprovada, o salbutamol e a cafeína estão associados a uma redução da elevação habitual concentração plasmática de potássio com o exercício físico (a qual provoca a redução da excitabilidade do músculo, levando à fadiga) e à melhoria da resistência física.³⁹

As alterações da composição corporal observadas nas diversas espécies animais nunca foram claramente comprovadas em humanos, sendo que Martineu e Caruso verificaram que a administração de 16 mg/dia de salbutamol durante 3 e 6 semanas não alterava a massa muscular ou a composição corporal. Também Le Panse obteve resultados semelhantes utilizando 12mg/dia durante 3 a 4 semanas. Contudo, dado que apenas o salbutamol foi utilizado, poderá não ter surtido efeito devido à semi-vida curta deste fármaco. Seria assim importante repetir os estudos com fármacos mais potentes e de semi-vida superior, como o clenbuterol, não fosse o facto de tal se considerar *doping*!³⁹

10. Conclusão

A utilização de substâncias químicas na tentativa de aumentar o desempenho desportivo é uma prática que remonta aos primórdios da actividade desportiva organizada. Entre as diversas substâncias com efeitos potencialmente ergogénicos encontram-se os agonistas β 2-adrenérgicos, estando actualmente a sua utilização banida pela WADA em virtude dos seus potenciais efeitos anabólicos, broncodilatadores e anti-inflamatórios.

A evidência científica existente fruto de estudos *in vitro* e em animais demonstra que estes fármacos têm a capacidade de provocar hipertrofia muscular em curtos espaços de tempo com a simultânea diminuição da gordura corporal (justificando a sua designação de fármacos distributivos). Este efeito parece estar sujeito a taquifilaxia, podendo ser sustentado pela sua administração cíclica, e pode ser mais ou menos pronunciado em músculos diferentes (de acordo com o seu *ratio* individual de fibras musculares tipo II/tipo I). Demonstram ainda potencial para provocar a transição entre fenótipos de fibras musculares, com o predomínio de fibras glicolíticas adequadas a esforço anaeróbio.

Assim, e de acordo com as alterações fenotípicas musculares observadas, os estudos funcionais em animais revelaram também que, embora vários parâmetros como a velocidade de contracção sofressem melhorias significativas, isto não se traduzia numa melhoria da resistência ao esforço aeróbico.

Já os estudos em humanos revelaram a importância que muitos outros factores (como a via de administração, a biodisponibilidade e o tempo de semi-vida) têm na tradução de um efeito ergogénico *in vitro* para *in vivo*. Todos os estudos com fármacos inalados em doses terapêuticas demonstraram que estas substâncias não conferem uma vantagem desportiva ao seu utilizador. Contudo, a evidência científica até à data suporta a existência de um efeito ergogénico se as mesmas substâncias forem administradas por via oral e em doses substancialmente superiores do que as habitualmente usadas por via inalatória.

Em todos os estudos realizados em humanos foi apenas avaliado um conjunto de parâmetros fisiológicos ou o desempenho de um exercício muscular e não a verdadeira *performance* de atletas em meio competitivo. Seria necessário estudar se estas variáveis se traduzem num benefício concreto no desempenho de uma actividade desportiva “no mundo real” e em que desportos estas substâncias poderiam, de facto, ser vantajosas (Desportos de combate? Halterofilismo?) ou deletérias (Ciclismo? Atletismo?), não fora o facto de se tratar de *doping*!

11. Agradecimentos

À Dr^a Mónica Mendes Pedro pela ajuda incansável, tempo e enorme disponibilidade que sempre teve comigo ao longo da realização deste trabalho e pela orientação e inspiração que tem dado ao meu percurso académico.

Aos meus pais, irmãos e restante família e amigos por me apoiarem nos momentos mais difíceis.

À Carlota Moutinho, por ser a minha companheira e “âncora” neste percurso difícil.

12. Bibliografia

1. Fitch K. Proscribed drugs at the Olympic Games: permitted use and misuse (doping) by athletes. *Clin Med (Lond)*. 2012;12(3):257-60.
2. Catlin DH, Fitch KD, Ljungqvist A. Medicine and science in the fight against doping in sport. *J Intern Med*. 2008;264(2):99-114.
3. https://c2.staticflickr.com/4/3020/2890999682_93a645db08_b.jpg
4. <http://biogeodb.stri.si.edu/bioinformatics/dfm/metastats/view/15261>
5. Docherty JR. Pharmacology of stimulants prohibited by the World Anti-Doping Agency (WADA). *Br J Pharmacol*. 2008;154(3):606-22.
6. Davis E, Loiacono R, Summers RJ. The rush to adrenaline: drugs in sport acting on the beta-adrenergic system. *Br J Pharmacol*. 2008;154(3):584-97.
7. Chabner B, Brunton L, Knollman B. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Twelfth Edition. McGraw-Hill Education / Medical; 2011.
8. Lynch GS, Ryall JG. Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. *Physiol Rev*. 2008;88(2):729-67.
9. https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/cell-communication-9/signaling-molecules-and-cellular-receptors-83/types-of-receptors-381-11607/images/fig-ch09_01_05/
10. <http://slideplayer.com/slide/3722401/>
11. Wannenes F, Magni L, Bonini M, et al. In vitro effects of Beta-2 agonists on skeletal muscle differentiation, hypertrophy, and atrophy. *World Allergy Organ J*. 2012;5(6):66-72.
12. Salleras L, Domínguez A, Mata E, Taberner JL, Moro I, Salvà P. Epidemiologic study of an outbreak of clenbuterol poisoning in Catalonia, Spain. *Public Health Rep*. 1995;110(3):338-42.
13. Kuiper HA, Noordam MY, Van dooren-flipsen MM, Schilt R, Roos AH. Illegal use of beta-adrenergic agonists: European Community. *J Anim Sci*. 1998;76(1):195-207.
14. Ramos F, Baeta ML, Reis J, Silveira MI. Evaluation of the illegal use of clenbuterol in Portuguese cattle farms from drinking water, urine, hair and feed samples. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2009;26(6):814-20.
15. Kindermann W, Meyer T. Inhaled beta2 agonists and performance in competitive athletes. *Br J Sports Med*. 2006;40 Suppl 1:i43-7.
16. Yang YT, Mcelligott MA. Multiple actions of beta-adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue. *Biochem J*. 1989;261(1):1-10.
17. Emery PW, Rothwell NJ, Stock MJ, Winter PD. Chronic effects of beta 2-adrenergic agonists on body composition and protein synthesis in the rat. *Biosci Rep*. 1984;4(1):83-91.
18. Rothwell NJ, Stock MJ. Effect of a selective beta 2-adrenergic agonist (clenbuterol) on energy balance and body composition in normal and protein deficient rats. *Biosci Rep*. 1987;7(12):933-40.

19. Sirvent P, Douillard A, Galbes O, et al. Effects of chronic administration of clenbuterol on contractile properties and calcium homeostasis in rat extensor digitorum longus muscle. *PLoS ONE*. 2014;9(6):e100281.
20. Hamby PL, Stouffer JR, Smith SB. Muscle metabolism and real-time ultrasound measurement of muscle and subcutaneous adipose tissue growth in lambs fed diets containing a beta-agonist. *J Anim Sci*. 1986;63(5):1410-7.
21. Koohmaraie M, Shackelford SD, Muggli-cockett NE, Stone RT. Effect of the beta-adrenergic agonist L644,969 on muscle growth, endogenous proteinase activities, and postmortem proteolysis in wether lambs. *J Anim Sci*. 1991;69(12):4823-35.
22. Schiavetta AM, Miller MF, Lunt DK, Davis SK, Smith SB. Adipose tissue cellularity and muscle growth in young steers fed the beta-adrenergic agonist clenbuterol for 50 days and after 78 days of withdrawal. *J Anim Sci*. 1990;68(11):3614-23.
23. Beermann DH. β -Adrenergic receptor agonist modulation of skeletal muscle growth. *J Anim Sci* 80 Suppl 1: E18–E23, 2002.
24. Kearns CF, McKeever KH. Clenbuterol and the horse revisited. *Vet J*. 2009;182(3):384-91.
25. Mounier R, Cavalié H, Lac G, Clottes E. Molecular impact of clenbuterol and isometric strength training on rat EDL muscles. *Pflugers Arch*. 2007;453(4):497-507.
26. Kearns CF, McKeever KH, Malinowski K, Struck MB, Abe T. Chronic administration of therapeutic levels of clenbuterol acts as a repartitioning agent. *J Appl Physiol*. 2001;91(5):2064-70.
27. Ross, Michael H., and Wojciech Pawlina. *Histology : a text and atlas : with correlated cell and molecular biology*. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, 2011. Print
28. Zeman RJ, Ludemann R, Easton TG, Etlinger JD. Slow to fast alterations in skeletal muscle fibers caused by clenbuterol, a beta 2-receptor agonist. *Am J Physiol*. 1988;254(6 Pt 1):E726-32.
29. Maltin CA, Hay SM, Delday MI, Lobley GE, Reeds PJ. The action of the β -agonist clenbuterol on protein metabolism in innervated and denervated phasic muscles. *Biochem J* 261: 965–971,1989.
30. Maltin CA, Delday MI, Hay SM, Smith FG, Lobley GE, Reeds PJ. The effect of the anabolic agent, clenbuterol, on overloaded rat skeletal muscle. *Biosci Rep*. 1987;7(2):143-9.
31. Beermann DH, Butler WR, Hogue DE, et al. Cimaterol-induced muscle hypertrophy and altered endocrine status in lambs. *J Anim Sci*. 1987;65(6):1514-24.
32. Dodd, S.L., Powers, S.K., Vrabis, I.S., Criswell, D., Stetson, S., Hussain, R., 1996. Effects of clenbuterol on contractile and biochemical properties of skeletal muscle. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 28, 669–676.
33. Ingalls CP, Barnes WS, Smith SB (1996). Interaction between clenbuterol and run training: effects on exercise performance and MLC isoform content
34. Duncan ND, Williams DA, Lynch GS. Deleterious effects of chronic clenbuterol treatment on endurance and sprint exercise performance in rats. *Clin Sci*. 2000;98(3):339-47.

35. Bell AW, Bauman DE, Beermann DH, Harrell RJ. Nutrition, development and efficacy of growth modifiers in livestock species. *J Nutr.* 1998;128(2 Suppl):360S-363S.
36. Martin WH 3rd, Murphree SS, Saffitz JE. α -Adrenergic receptor distribution among muscle fiber types and resistance arterioles of white, red, intermediate skeletal muscle. *Circ Res* 64: 1096–1105, 1989.
37. <http://www.afh.bio.br/nervoso/img/Nervos5ab.jpg>
38. Katzung, Bertram G., and Anthony J. Trevor. *Basic and clinical pharmacology*. New York: McGraw-Hill Education, 2015. Print.
39. Collomp K, Le Panse B, Candau R, Lecoq AM, De Ceaurriz J. Beta-2 agonists and exercise performance in humans. *Science & Sports* (2010) **25**, 281—290
40. Wolfarth B, Wuestenfeld JC, Kindermann W. Ergogenic effects of inhaled beta2-agonists in non-asthmatic athletes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010;39(1):75-87, ix.
41. <https://i.ytimg.com/vi/TCfgA3SurnM/maxresdefault.jpg>
42. Ryall JG, Sillence MN, Lynch GS. Systemic administration of beta2-adrenoceptor agonists, formoterol and salmeterol, elicit skeletal muscle hypertrophy in rats at micromolar doses. *Br J Pharmacol.* 2006;147(6):587-95.
43. Murphy R, Be'tiveau L, Seburn K, Gardiner P (1996). Clenbuterol has a greater influence on untrained than on previously trained skeletal muscle in rats. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 73: 304–310.
44. Ryall JG, Gregorevic P, Plant DR, Sillence MN, Lynch GS. Beta 2-agonist fenoterol has greater effects on contractile function of rat skeletal muscles than clenbuterol. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002;283(6):R1386-94.
45. Johnson BJ, Smith SB, Chung KY. Historical Overview of the Effect of β -Adrenergic Agonists on Beef Cattle Production. *Asian-australas J Anim Sci.* 2014;27(5):757-66.
46. Crivelli G, Millet GP, Gremion G, Borrani F. Effects of salbutamol on the contractile properties of human skeletal muscle before and after fatigue. *Acta Physiol (Oxf).* 2011;203(2):311-20.
47. McDowell SL, Fleck SJ, Storms WW. The effects of salmeterol on power output in nonasthmatic athletes. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;99(4):443-9.
48. Ryall JG, Lynch GS. The potential and the pitfalls of beta-adrenoceptor agonists for the management of skeletal muscle wasting. *Pharmacol Ther.* 2008;120(3):219-32.
49. Naranjo orellana J, Centeno prada RA, Carranza márquez MD. Use of beta2 agonists in sport: are the present criteria right?. *Br J Sports Med.* 2006;40(4):363-6.
50. Orellana JN, Márquez MD. β -2 agonists in sport: are the anti-doping rules meeting the needs of asthmatic athletes?. *Br J Sports Med.* 2011;45(10):809-12.
51. Sandsund M, Sue-chu M, Helgerud J, Reinertsen RE, Bjørmer L. Effect of cold exposure (-15 degrees C) and salbutamol treatment on physical performance in elite nonasthmatic cross-country skiers. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1998;77(4):297-304.

52. Koch S, Karacabeyli D, Galts C, Macinnis MJ, Sporer BC, Koehle MS. Effects of inhaled bronchodilators on lung function and cycling performance in female athletes with and without exercise-induced bronchoconstriction. *J Sci Med Sport*. 2015;18(5):607-12.
53. Hostrup M, Kalsen A, Bangsbo J, Hemmersbach P, Karlsson S, Backer V. High-dose inhaled terbutaline increases muscle strength and enhances maximal sprint performance in trained men. *Eur J Appl Physiol*. 2014;114(12):2499-508.
54. Reeds PJ, Hay SM, Dorwood PM, Palmer RM. Stimulation of muscle growth by clenbuterol: lack of effect on muscle protein biosynthesis. *Br J Nutr*. 1986;56(1):249-58.
55. Lefkowitz RJ, Pierce KL, Luttrell LM. Dancing with different partners: protein kinase a phosphorylation of seven membrane-spanning receptors regulates their G protein-coupling specificity. *Mol Pharmacol*. 2002;62(5):971-4.
56. Strosberg AD. Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. *Protein Sci*. 1993;2(8):1198-209.